



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

"ESTUDIO DE INGENIERIA DE VIAS METABOLICAS SOBRE LA PRODUCCION DE ACIDO ACETICO EN MUTANTES AFECTADAS EN EL METABOLISMO DE PEP"

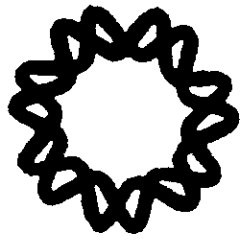
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA

P R E S E N T A :

M. en C. ROBERTO SIGÜENZA LOPEZ



CUERNAVACA, MORELOS

1999

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

272838



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Fernando Valle Baheza. Para la realización de este trabajo se contó con el apoyo económico de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) a través del proyecto IN206696, del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través del proyecto 25375 y la beca 93834, y de la compañía Genencor International.

A la memoria de:

Don Beto

Don Gaspar

El Afas

Ausentes de maravilla

Agradecimientos

Agradezco de todo corazón a todas aquellas personas que a lo largo del camino me han tendido la mano, para alcanzar la altura insigne de este asunto que se llama, vivir la vida: A la presencia infinitamente amorosa, paciente, alentadora y solidaria de **Dofia Mago, mi madre**; al amor incondicional de la tía Angelita y del padrino Eleuterio, de la tía Leovi y del tío Balta; a mis queridísimos hermanos Roci, Benja, Coni y Vicky, porque yo sin ellos no soy nada; a Irma por el cariño, la amistad, el hogar...su mundo; a Alfredo G. R. por ser de los amigos que uno siempre tiene presente; a Sylvie, por dejarme entrar en su vida, por el mundo que compartimos, y por esa esperanza que nos ha hecho amigos entrañables; a Eugenia...mi más querida amiga...por estar presente ayer, hoy y siempre; a Elías y Juan por ser grandes amigos, y por el apoyo incondicional; a Joel por la amistad, la solidaridad y por ser un verdadero Maestro; a Leobardo O. C., Maestro y amigo, siempre consecuente, esta tesis también es tuya; a Vicky Pando y familia que la acompaña, por las tardes, los días buenos...las pláticas para componer el mundo; a Vero R. M. por la maravilla de su compañía en tardes y noches alucinadas; muy especialmente a Queta, amiga luminosa, por saber demostrar una amistad y solidaridad sin límites; a Bárbara S. por la nobleza, la serenidad y esa lúcida amistad que siempre extraño; a Inés y el Chemitita con cariño, por ser buenos primos....inolvidables; al primo Arturo, que se nos fue buscando las huellas terribles de Syd Barret...brilla, brilla, sigue brillando, diamante loco; al Dr. Francisco Bolívar por la preocupación y el apoyo, y por estar siempre entre nosotros para hacer la diferencia; a Fernando Valle, Noemí Flores y Alfredo Martínez por la paciencia, el apoyo, los regaños y desde luego, porque son unos buenazos; a todos y cada uno de mis compañeros de laboratorio, siempre fueron buena compañía, especialmente a Janet, Quique, Monchito, Jorge O. S., José Luis, Aris y Alfredo Morales por la amistad y la solidaridad; a Mario y Tonatiuh por el apoyo y sus valiosas críticas; a Amelia, Gloria, Agustín, Guillermo, Rafael, y Baltazar, por las excelentes y constructivas críticas a mi trabajo; a la esperanza que Don Ernesto dejó regada por el mundo; al Gabo por el Otoño del Patriarca; a Juan Rulfo[†], por ser el más grande, y porque la razón le asiste...*todos somos hijos de Pedro Páramo*; al Gis y al Trino por sus cartones; al Santos y al Bludemos, ah!!! y a la Tetona Mendoza; y también a todos aquellos innominados, cuerdos y locos, que a lo largo de los años el viento ha traído hasta mi bahía, y se han ido quedando en las playas de mi corazón como conchitas y moluscos, preciosos, alucinados y tenues.

Indice general

Indice de figuras	iii
Indice de tablas	iv
Nomenclatura	v
Resumen	1
Abstract	4
1.0 Antecedentes	7
2.0 Justificación	12
3.0 Objetivos	19
4.0 Generalidades	21
4.1 Introducción	22
4.2 El metabolismo central en la producción de ácido acético	22
4.3 Velocidad específica y concentración de sustrato en la producción de ácido acético.	25
4.4 Ingeniería de vías metabólicas en la producción de ácido acético	25
4.5 Las mutantes PTS- y pykApykF y su relación con la producción de ácido acético.	31
5.0 Materiales y métodos	35
5.1 Microorganismos.	36
5.2 Medios de cultivo.	36
5.3 Experimentos en fermentador.	36
5.4 Métodos analíticos.	37
5.5 Cálculo de flujos metabólicos.	38
5.6 Estrategia experimental.	44
6.0 Resultados	47
6.1 Experimentos en cultivo por lote. Medios mínimo y complejo.	48
6.2 Experimentos en cultivo continuo.	55
6.3 Análisis de flujos intracelulares.	59

7.0	Discusión	87
7.1	Experimentos en cultivo por lote.	90
7.2	Experimentos en cultivo continuo.	93
8.0	Conclusiones	100
9.0	Referencias	103

Indice de figuras

Figura	Página
1. Esquema parcial del metabolismo de <i>Escherichia coli</i> .	14
2. Representación del modelo para la fosforilación de la glucosa.	32
3. Diagrama de flujo del algoritmo del programa BIONET.	41
4. Esquema de estrategia experimental.	45
5. Perfiles de cinética de crecimiento en cultivo por lote. Medio M9.	49
6. Perfiles de cinética de crecimiento en cultivo por lote : Medio complejo.	50
7. Perfiles de cinética en cultivo continuo. Rendimientos: $Y_{X/S}$ y $Y_{HAC/X}$.	56
8. Perfiles de cinética en cultivo continuo. Velocidades específicas: q_S , q_{CO_2} y q_{O_2} .	58
9. Representación esquemática del metabolismo de <i>Escherichia coli</i> .	60
10. Distribución de flujos de carbono de la cepa JM101 a 0.2 h^{-1} .	69
11. Distribución de flujos de carbono de la cepa JM101 a 0.3 h^{-1} .	70
12. Distribución de flujos de carbono de la cepa JM101 a 0.35 h^{-1} .	71
13. Distribución de flujos de carbono de la cepa JM101 a 0.5 h^{-1} .	72
14. Distribución de flujos de carbono de la cepa PB12 a 0.2 h^{-1} .	73
15. Distribución de flujos de carbono de la cepa PB12 a 0.3 h^{-1} .	74
16. Distribución de flujos de carbono de la cepa PB12 a 0.35 h^{-1} .	75
17. Distribución de flujos de carbono de la cepa PB12 a 0.5 h^{-1} .	76
18. Distribución de flujos de carbono de la cepa PB25 a 0.2 h^{-1} .	77
19. Distribución de flujos de carbono de la cepa PB25 a 0.3 h^{-1} .	78
20. Distribución de flujos de carbono de la cepa PB25 a 0.35 h^{-1} .	79
21. Distribución de flujos de carbono de la cepa JM101 a 0.5 h^{-1} .	80
22. Flujos de carbono en la glucosa fosfato isomerasa.	82
23. Flujos de carbono en la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa.	83
24. Flujos de carbono en la citrato cintasa.	86

Indice de Tablas

1. Resumen de resultados en cultivo por lote. Medio mínimo.	52
2. Resumen de resultados en cultivo por lote. Medio complejo.	53
3. Sistema de ecuaciones metabólicas de <i>Escherichia coli</i> JM101.	61
4. Sistema de ecuaciones metabólicas de <i>Escherichia coli</i> PB12.	62
5. Sistema de ecuaciones metabólicas de <i>Escherichia coli</i> PB25.	63
6. Representación del vector columna de metabolitos.	64
7. Demanda de metabolitos para <i>Escherichia coli</i> .	66
8. Velocidades y estimados de producción de metabolitos.	67

NOMENCLATURA

AC: Acetato

ACCOA: Acetil Coenzima A

AKG: Alfa ceto-glutarato

ATP: 5'-trifosfato de adenosina

BIOMAS: Biomasa

CO₂: Dióxido de carbono

E4P: Eritrosa 4-fosfato

FADH: Flavina adenina dinucleótido reducido

FRU6P: Fructosa 6-fosfato

G3P: 3-fosfoglicerato

GAP: Gliceraldehido 3-fosfato

GLC : glucosa

GLC6P: Glucosa 6-fosfato

GLYC: Glucógeno

ISOCIT: Isocitrato

LAC: Lactato

MAL: Malato

NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido reducido

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido

O₂: Oxígeno

OAA: Oxalacetato

PEP: Fosfoenolpiruvato

PYR: Piruvato

RIB5P: Ribosa 5-fosfato

RIBU5P: Ribulosa 5-fosfato

SED7P: Sedoheptulosa 5-fosfato

SUC: Succinato

SUCCOA: Succinil coenzima A

XYL5P: Xilosa 5-fosfato

D: Velocidad de dilución (h^{-1})

q_{CO_2} : Producción específica de CO_2 (mM de oxígeno consumido/g de células producidas)

q_{HAC} : Producción específica de ácido acético (g de ácido acético producido/g de células producidas/h)

q_O : Consumo específico de oxígeno (mM de oxígeno consumido/g de células producidas/h)

q_S : Consumo específico de glucosa (g de glucosa consumida/g de células producidas/h)

$Y_{X/S}$: Rendimiento celular (g de células producidas/g de glucosa consumida)

$Y_{HAC/X}$: Rendimiento de ácido acético (g de ácido acético producido/g de células producidas/h)

μ_{max} : Velocidad específica de crecimiento máxima (h^{-1})

RESUMEN

En este trabajo se examinaron las cinéticas de crecimiento de dos cepas mutantes de *Escherichia coli*, así como de la cepa progenitora, con el objeto de conocer aspectos cinéticos y metabólicos relacionados con su capacidad de acumulación de ácido acético. Un primer enfoque estuvo vinculado con la necesidad de conocer en términos cinéticos la influencia de las mutaciones sobre dicha capacidad acumulativa, y un segundo enfoque se planteó en términos de conocer las repercusiones de las mutaciones sobre la distribución de los flujos de carbono intracelular, y como estos determinaron la capacidad acumulativa de ácido acético. Los experimentos se llevaron a cabo en cultivo por lote, en medios mínimo y complejo, y en un quimiostato limitado por glucosa en medio mínimo. En una de las cepas mutantes (PB12) el sistema fosfotransferasa (PTS) fue inactivado, mientras que en la otra cepa (PB25) los dos genes que codifican para la expresión de las isoenzimas piruvato cinasa fueron interrumpidos. En ambos esquemas de cultivo se encontraron diferencias en relación con su capacidad para acumular ácido acético, así como en sus actividades anabólicas y catabólicas. En cultivo por lote empleando un medio mínimo, se observó una reducción en la capacidad de acumulación de ácido acético de 80 y 25% en las cepas PB12 y PB25 respectivamente, comparadas con la cepa silvestre. Se examinaron también las cinéticas en cultivo por lote de las mutantes citadas, empleando un medio rico. En este caso también se observaron diferencias importantes en la acumulación de ácido acético. Las cepas PB12 y PB25 mostraron una reducción en la acumulación de ácido acético de 75 y 12% respectivamente, comparadas con la cepa silvestre. Con la cepa PB12 se observó una mayor eficiencia en la transformación de la glucosa, lo cual se tradujo en menor consumo específico de glucosa y un mayor rendimiento de biomasa, comparado con las otras cepas.

Los experimentos realizados en cultivo continuo empleando un medio mínimo, revelaron que el fondo genético fue el responsable de los cambios observados en la capacidad acumulativa de ambas mutantes. La cepa PB25 acumuló menos ácido acético en función de la velocidad de dilución, comparada con las cepas silvestre y PB12. Así mismo, se puso de manifiesto que las actividades metabólicas oxido-reductoras fueron substancialmente afectadas en las dos cepas mutantes, lo cual se reflejó en diferentes niveles de producción de biomasa y CO₂, así como en el consumo de oxígeno. Este comportamiento se reflejó de

modo congruente en las distribuciones de flujos de carbono calculadas mediante el empleo de modelos metabólicos (redes de flujos metabólicos), para cada una de las cepas en las diferentes velocidades de dilución ensayadas. En el caso de la cepa PB12, en ausencia de acumulación de ácido acético, el modelo metabólico propuesto predijo flujos de carbono en las vías del metabolismo central similares a los observados en la cepa silvestre, sin embargo, a velocidades de dilución de 0.35 y 0.5 h⁻¹, en las cuales se puso de manifiesto la acumulación de ácido acético, los flujos de carbono fueron ligeramente diferentes, y su influencia sobre la acumulación de ácido acético, estuvo asociada a diferentes causas. A una velocidad de dilución de 0.35 h⁻¹, la reducción en los niveles de acumulación de ácido acético pudo deberse a un aumento en el flujo de carbono hacia el ciclo de los TCA, y la reducción observada a una velocidad de dilución de 0.5 h⁻¹, a un aumento del flujo de carbono hacia la vía de las pentosas. Por otro lado, en la cepa PB25, el modelo metabólico predijo que la reducción en los niveles de acumulación de ácido acético probablemente se debió al aumento sustancial del flujo de carbono hacia la vía de las pentosas, en comparación con el observado por la cepa silvestre. El modelo también predijo la formación de un ciclo de oxidación a través de la reacción catalizada por la glucosa fosfato isomerasa asociado al aumento del flujo hacia la vía de las pentosas.

ABSTRACT

In this work the growth kinetics of two mutant strains of *Escherichia coli* were examined as well as of the parental strain, in order to know kinetic and metabolic aspects related to their capability of acetic acid accumulation. A first approach was coupled with the necessity of knowing in kinetic terms the influence of the mutations on this accumulative capability, and a second one was postulated in terms of knowing the repercussions of the mutations on the distribution of the intracellular carbon fluxes, and how these fluxes determined the accumulative capability of acetic acid. The experiments were carried out in batch cultivation, in mineral and complex media, and in continuous culture using a mineral medium supplemented with glucose. In one of the mutant strains (PB12) the fosfotransferase system (PTS) was inactivated, while in the other (PB25), the two genes that code for the expression of the piruvate kinase isoenzymes were interrupted. In both cultivation frameworks there were differences related to their capability to accumulate acetic acid, as well as in their anabolic and catabolic activities. In batch cultivation, using a minimal medium, a reduction of acetic acid accumulation of 80 and 25% in the strains PB12 and PB25 respectively was observed, when compared with the wild type strain. The kinetics of the mentioned mutants were also examined in batch cultivation using a rich medium. In this case, important differences were observed in the acetic acid accumulation profiles. The PB12 and PB25 strains, showed a reduction in the acetic acid accumulation of 75 and 12% respectively, when compared to the wild type strain. With the PB12 strain a bigger efficiency was observed in the transformation of the glucose. In consequence a smaller specific glucose consumption rate and a bigger yield of biomass, was observed compared to the other strains.

The experiments carried out in continuous cultivation using a minimal medium, revealed that the genetic background was responsible of the changes observed in the acid acetic accumulative capability. The PB25 strain accumulated a lower acetic acid concentration as a function of the dilution rate, compared with the wild type and PB12 strains. Furthermore, it was showed that the oxide-reductives metabolic activities were substantially affected in the two mutants strains, which was reflected in different levels of biomass and CO₂ production, as well as in the oxygen consumption. This behavior was reflected in an appropriate way on the carbon flux distributions, calculated by using metabolic models (bioreaction networks),

for each one of the strains tested at different dilution rates. In the case of the PB12 strain, in absence of acetic acid accumulation, the proposed metabolic network predicted similar carbon fluxes in central metabolism to those observed in the wild type strain, however, at dilution rates of 0.35 and 0.5 h⁻¹, in which acetic acid accumulation was observed, the carbon fluxes were slightly different compared to the wild type, and the influence of these fluxes over the acetic acid accumulation was associated to different causes. At a dilution rate of 0.35 h⁻¹, the reduction in the levels of acetic acid accumulation could be due to an increase in the carbon flux toward the TCA cycle, and the reduction observed at a dilution rate of 0.5 h⁻¹, to an increase of the carbon flux toward the pentoses pathway. On the other hand, in the PB25 strain, the proposed metabolic network predicted that the reduction in the levels of acetic acid accumulation was probably due to a substantial increase of the carbon flux toward the pentoses pathway, in comparison with that observed by the wild type strain. The metabolic network also predicted the formation of an oxidation cycle through the reaction catalyzed by the glucose phosphate isomerase, which was associated to the increase of the carbon flux toward the pentoses pathway.

1.0 ANTECEDENTES

Desde diversos ángulos académicos, *Escherichia coli* es uno de los microorganismos más estudiados. Esto incluye estudios exhaustivos tanto genéticos como fisiológicos. Desde un principio, la versatilidad de esta bacteria se puso de manifiesto por la relativa facilidad para propagarla y manipularla genéticamente. Esta característica la convirtió con el tiempo, en una pieza fundamental para sentar las bases de la tecnología recombinante. Gracias en parte a este microorganismo, en la actualidad existe una floreciente industria biotecnológica la cual ha colocado en el mercado una gran variedad de productos farmacéuticos y especialidades químicas de un alto valor agregado (Swartz, 1996).

Los microorganismos poseen un conjunto de rasgos genotípicos y fenotípicos adquiridos a través de la evolución. Eso define el papel y desempeño de cada microorganismo en la naturaleza, así como las características de crecimiento en un ambiente particular. Sin embargo, la experiencia ha venido mostrando que el *diseño metabólico* conferido por la evolución no necesariamente es el más adecuado si lo que se requiere es desplegar una serie de funciones metabólicas específicas en un reactor de producción. En este sentido, una de las orientaciones actuales más importantes de la tecnología recombinante está vinculada con el mejoramiento de las cualidades metabólicas de las cepas que se emplean en procesos industriales. Vista como una estrategia vital y permanente, la optimización de las características productivas de un microorganismo industrial permite a las grandes compañías un mejor empleo de los recursos y a la vez permanecer en un mercado muy competitivo. En relación con esto, es pertinente mencionar que la disminución de costos de operación y de recuperación de producto es un problema cotidiano en la industria dedicada a la producción de especialidades químicas por fermentación, tales como etanol, aminoácidos, etc. El aumento del rendimiento y la concentración de producto, así como la productividad del proceso de fermentación son aspectos críticos en el planteamiento de soluciones a este problema (Atkinson et al., 1992).

En los últimos años, las técnicas que permiten el mejoramiento genético de los microorganismos se han desarrollado considerablemente. Los primeros intentos en este campo estaban supeditados al aislamiento de mutantes obtenidas por exposición a

mutágenos, con el fin de alterar las funciones reguladoras del metabolismo, o bien de transporte de metabolitos a través de la membrana (Bailey et al., 1990). El advenimiento de la tecnología recombinante trajo consigo la posibilidad de usar plásmidos estables como vehículos de expresión, con el objeto de mejorar la actividad enzimática en pasos específicos de una vía metabólica de interés. En algunos casos este procedimiento estaba ligado a un proceso de desregulación de reacciones críticas intermedias, empleando mutagénesis tradicional (Sahm, 1991). Sin embargo, a medida que la manipulación genética de los microorganismos se vio facilitada por el desarrollo de mas y mejores técnicas, y se comenzaron a entender mas claramente los mecanismos genético-moleculares que rigen el funcionamiento del metabolismo, aparecieron nuevos principios y metodologías que permitieron mejorar sustancialmente el desempeño de los microorganismos de interés industrial. Una de estas metodologías es la *ingeniería de vías metabólicas*, la cual, mediante el uso de técnicas de DNA recombinante persigue la identificación y modificación de aquellas funciones celulares que son críticas para el desarrollo de cualidades superiores en el desempeño de un microorganismo industrial (Bailey, 1991).

Por otro lado, el ácido acético, el cual es producido naturalmente por algunas bacterias durante el proceso fermentativo, siendo además de índole tóxica para el propio microorganismo que lo genera, se ha venido considerando uno de los problemas más importantes de la industria de fermentaciones. La gravedad del problema reside en el hecho de que la producción de ácido acético tiene un efecto inhibitorio sobre el crecimiento celular, así como un impacto negativo sobre los niveles de rendimiento celular y de producto (Kleman & Strohl, 1994; Konstantinov et al., 1990). Esto es particularmente crítico en cepas de *Escherichia coli*, cuyo uso como hospedero está ampliamente difundido en la generación de productos recombinantes de interés industrial.

Existe el consenso de que acumulación de ácido acético está asociada en principio, a la presencia de altas concentraciones de glucosa. En la búsqueda de soluciones a este problema, ampliamente documentada en la literatura, se pueden distinguir dos enfoques básicos. Uno de ellos aborda la cuestión como un problema de bioingeniería. El objetivo en

este caso, es el control adecuado de la condición ambiental que dio origen al problema, es decir, una concentración alta de sustrato. Lo anterior requiere de un conocimiento profundo de las características cinéticas del proceso fermentativo, así como de elaborados algoritmos que permitan programar el suministro de la glucosa a bajas velocidades en un esquema de cultivo por lote alimentado (Konstantinov et al., 1990; Riesenbergr et al., 1990; Strandberg & Enfors, 1991). Por otro lado, la *ingeniería de vías metabólicas* enfoca la acumulación de ácido acético como un problema de *diseño metabólico*, en este caso, el problema sería consecuencia de un desborde metabólico provocado por una *inadecuada* distribución de flujos de carbono en el metabolismo celular, particularmente en el metabolismo central. Mediante este enfoque, el objetivo es identificar los mecanismos fisiológicos que están influidos por las concentraciones altas de glucosa, los cuales a su vez definen los flujos metabólicos *inconvenientes*, con el fin de realizar modificaciones posteriores empleando técnicas de ingeniería genética (Aristidou, et al., 1994; Chou, et al., 1994; Dedhia, et al., 1994; Díaz-Ricci, et al., 1991; Farmer & Liao, 1997). Con esta metodología es posible un acercamiento más razonado a los estudios de mejoramiento genético, debido a que permite calcular los flujos de carbono intracelulares mediante el empleo de modelos metabólicos en forma de redes de biorreacciones. Los cálculos teóricos o aquellos elaborados a partir de datos experimentales empleando este tipo de modelos, permiten identificar o en su caso predecir los puntos del metabolismo celular que son limitantes al flujo de carbono, con lo cual es posible realizar de un modo más dirigido modificaciones posteriores empleando técnicas de ingeniería genética. Como se verá más adelante, ambas estrategias han probado en alguna medida ser capaces de reducir la producción de ácido acético, así como sus efectos nocivos. Sin embargo, es evidente la ventaja de la segunda sobre la primera opción, ya que la eliminación de costosos esquemas de control de la fermentación tendría un impacto positivo sobre los costos de inversión y de operación de un proceso de fermentación industrial.

Diversos estudios realizados con cepas de *Escherichia coli* sugieren que la producción de ácido acético se debe en primer lugar, a un desborde metabólico provocado por una limitada capacidad en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA) (Han et al., 1992; Majewski &

Domach, 1990). Esta limitación puede deberse a un efecto de represión catabólica estimulada por la presencia de altas concentraciones de glucosa, o por actividad enzimática insuficiente a altas velocidades de crecimiento (Doelle et al., 1982). También ha sido sugerido que el fenómeno es producto de una insuficiente actividad de las enzimas de la cadena de transporte de electrones y por ende, de un efecto de represión catabólica sobre algunas enzimas del ciclo de los TCA, debido a la acumulación de NADH (Varma & Palsson, 1994). Es importante puntualizar que en teoría, existen ciertos puntos críticos en la vía glicolítica que afectan de un modo determinante la distribución de flujos de carbono en el metabolismo central, y que tienen a su vez una relación con la acumulación de ácido acético (Delgado & Liao, 1997). Entre estos se pueden citar las vías anapleróticas, la vía de las pentosas y algunos pasos intermedios en la vía glicolítica. Para hacer aún más complejo el contexto, es probable que además exista una relación hasta ahora no estudiada, con las actividades desplegadas por el sistema fosfotransferasa (PTS) y las izoenzimas piruvato cinasa (PK) en el llamado *nodo del fosfoenolpiruvato* (PEP), ya que el control de la disponibilidad de piruvato está supeditada al funcionamiento de estos dos sistemas enzimáticos (Postma et al., 1996; Valle et al., 1996). No obstante, en este último caso, la falta de estudios apropiados no ha permitido aclarar en qué medida se ve afectada la distribución de flujos de carbono cuando se altera el reparto de carbono en un punto crucial de la vía glicolítica, como lo es el nodo del PEP. En consecuencia, sigue siendo considerado como un punto clave para controlar la disponibilidad de PEP y piruvato en el metabolismo central de *Escherichia coli*, y particularmente como un objetivo para estudios de ingeniería de vías metabólicas (Goel et al., 1995; Holms, 1986; Valle et al., 1996).

Los antecedentes expuestos dejan ver claramente la pertinencia e importancia que reviste un estudio experimental y teórico que permita conocer la relación del nodo del PEP con la producción de ácido acético en el metabolismo central de *Escherichia coli*. Ahondar en este conocimiento contribuiría al entendimiento de los mecanismos del metabolismo central que disparan la acumulación de este metabolito en cepas de *Escherichia coli*, mismas que podrían ser usadas como hospederos en la producción de proteínas recombinantes y metabolitos de interés comercial.

2.0 JUSTIFICACION

Desde hace algún tiempo, en nuestro laboratorio se han venido desarrollando actividades de mejoramiento genético de cepas de interés industrial. Aprovechando la amplia experiencia del grupo en el manejo de técnicas de ingeniería genética, se ha planteado como una estrategia permanente el conocer a profundidad aspectos genéticos y metabólicos de algunas cepas de *Escherichia coli*. Sin embargo, esto es insuficiente cuando se requiere conocer a profundidad el comportamiento cinético y metabólico de un microorganismo cuya complejidad requiere del manejo de técnicas asociadas a otras áreas tales como la ingeniería química y tecnología de fermentaciones. En este sentido, la aparición de herramientas relativamente inéditas, como las agrupadas en el concepto de *ingeniería de vías metabólicas*, abre la posibilidad de realizar un trabajo de investigación novedoso y más razonado en este proceso de mejoramiento. Es importante recalcar que uno de los objetivos del grupo es también el mejoramiento de las características de desempeño de estas cepas en los reactores de producción, por medio de la reducción de la capacidad de estas cepas para acumular ácido acético.

Un ejemplo del trabajo que se desarrolla en nuestro laboratorio, está vinculado con la modificación genética de cepas involucradas en la producción industrial de aminoácidos aromáticos. La Figura 1 muestra un esquema de las vías del metabolismo central de *Escherichia coli* relacionadas con la producción de ácido acético y dichos aminoácidos. Como se observa, en la vía glicolítica, a partir de una mol de glucosa se pueden producir a lo máximo dos moles de PEP. De éstas, una mol se emplea en el transporte y fosforilación de una mol de glucosa y se genera a su vez una mol de piruvato (Postma et al., 1996). El PEP restante se canaliza hacia la formación de piruvato, de oxaloacetato y aminoácidos aromáticos. Cabe destacar que la formación de una mol de estos aminoácidos, requiere de dos moles de PEP. Desde el punto de vista de la ingeniería de vías metabólicas, el nodo del PEP sería un importante objetivo para modificar la distribución del flujo de carbono y resolverla en favor de un aumento significativo de la acumulación de aminoácidos aromáticos (Valle et al., 1996).

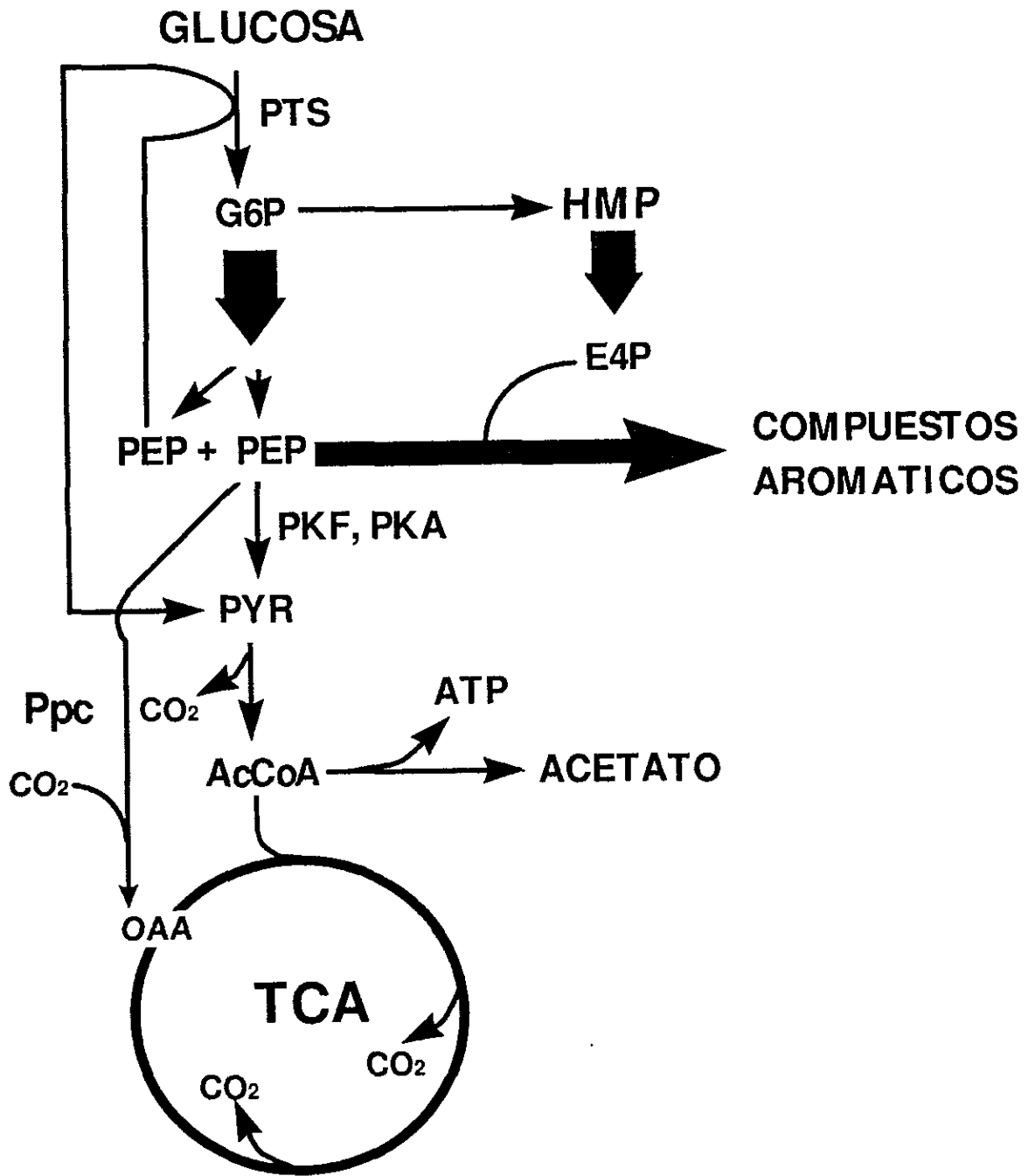


Figura 1. Esquema parcial del metabolismo central de *E. coli* y su relación con la producción de aminoácidos aromáticos

Bajo esta premisa y teniendo como objetivo aumentar el rendimiento de aminoácidos aromáticos, se crearon dos mutantes derivadas de la cepa silvestre de *Escherichia coli* JM101, afectadas en el nodo participante del metabolismo de PEP. Como se sabe, un aumento en el rendimiento de estos aminoácidos depende fundamentalmente de incrementar la disponibilidad de PEP en la vía de síntesis de los aromáticos. Una de estas cepas, la PB12, posee una delección de los genes *ptsH*, *ptsI* y *crr*, genes que codifican para la síntesis de las proteínas que conforman la parte del sistema fosfotransferasa asociado al transporte de glucosa. Además, posee una inserción de un marcador de selección en la misma región. Esta cepa, así mismo, posee la característica de ser una mutante espontánea que ha mostrado ser capaz de crecer en presencia de glucosa, empleando un sistema alternativo de transporte (Flores et al. 1996). A la cepa PB25, también le fue insertado un marcador de selección en los genes *pykA* y *pykF* los cuales codifican para la síntesis de las isoenzimas piruvato cinasa, con el objeto de inactivarlos (Ponce et al. 1995). Tanto en nuestro laboratorio como en los de Genencor Int, se llevaron a cabo pruebas de crecimiento con cepas similares a las mencionadas en condiciones preestablecidas para sobreproducir 3-desoxi-arabino-heptulosoato 7-fosfato (DAHP), el cual es el primer intermediario de la vía de síntesis de aminoácidos aromáticos. Los resultados indicaron una mejora sustancial en los rendimientos de DAHP, comparados con los mostrados por la cepa progenitora (Berry 1996; Flores et al. 1996; Gosset et al. 1996).

Por otro lado, si visualizamos con un enfoque diferente la naturaleza y el efecto de las mutaciones en este punto del metabolismo central de *Escherichia coli*, más allá de las posibilidades mostradas por estas cepas como sobreproductoras de aminoácidos aromáticos, se podrán percibir aspectos fisiológicos y cinéticos interesantes a esclarecer. Uno de estos es la relación que guardan el carácter de las mutaciones con la producción de ácido acético, y de modo concomitante, con la distribución de los flujos de carbono en el metabolismo central asociada a la acumulación de este ácido orgánico. Es importante mencionar que los primeros experimentos en cultivo por lote a nivel de fermentador realizados en nuestro laboratorio, permitieron ver las posibilidades de estas cepas para ser empleadas como hospederos para la producción de proteínas heterólogas. Este planteamiento surgió como

consecuencia de haberse observado de manera consistente una disminución en las concentraciones de ácido acético, comparadas con la cepa progenitora, tanto en la mutante PTS⁻ como en la doble mutante *pykApykF*, cuando el crecimiento se llevó a cabo en biorreactores bajo condiciones ambientales controladas. Sin embargo, al haberse observado valores de μ significativamente menores al observado por la cepa progenitora, también se reflexionó acerca de si el efecto era realmente producto del fondo genético y no de las diferencias mostradas en los valores de μ . Lo anterior sugirió la pertinencia de realizar estudios cinéticos en cultivo continuo, en los cuales es posible ajustar la velocidad específica de crecimiento por medio del flujo de alimentación de sustrato y conocer el efecto real del fondo genético. Por otro lado, en un razonamiento posterior, se esbozaron las posibilidades de enfocar las actividades de nuestro laboratorio desde la óptica del concepto de ingeniería de vías metabólicas, lo cual permitiría abrir posibilidades de un trabajo de mejoramiento genético y metabólico más razonado. En este sentido es importante mencionar algunos de los beneficios posibles al implementar una herramienta de esta naturaleza. Por un lado, permitiría avanzar en el conocimiento científico relacionado con la caracterización del comportamiento cinético de un microorganismo (entendiéndose este concepto como aquellos experimentos que nos permiten obtener información en forma de parámetros propios del crecimiento, tales como velocidades específicas de crecimiento, rendimientos celulares y de producto, así como velocidades específicas de consumo y producción de nutrientes y metabolitos, respectivamente), ya que además de la información propiamente cinética, con esta herramienta se podría tener una idea más clara de los efectos sobre la distribución de los flujos de carbono en el metabolismo provocados por mutaciones realizadas con propósitos específicos, tales como aquellas que portan las cepas PB12 y PB25. En otras palabras, al implementar esta tecnología, se podría contar con una instantánea del comportamiento microbiano en un estado fisiológico particular. Por otro lado, sería muy importante para nuestro laboratorio contar con un conjunto de herramientas que permitieran orientar el trabajo de mejoramiento genético de un modo más razonado, mediante la caracterización de flujos metabólicos, así como el reconocimiento de aquellas reacciones que son limitantes para dichos flujos en una vía metabólica de interés.

En relación con la posibilidad de emplear a las mutantes PB12 y PB25 como parte de sistemas recombinantes de producción de proteínas heterólogas, es de particular interés para nuestro laboratorio conocer el comportamiento cinético de estas cepas en un medio complejo, básicamente en relación con su capacidad de acumulación de ácido acético. Este tipo de medios cumple la función de suministrar nutrientes para crecimiento celular, particularmente aminoácidos y cofactores, con lo cual se satisfacen las necesidades provocadas por la carga metabólica en sistemas recombinantes cuando el objetivo es producir proteínas de cierta complejidad. Lo anterior llevó al planteamiento de realizar algunos experimentos en fermentador empleando uno de estos medios, con el fin de conocer el efecto de las mutaciones presentes en las cepas PB12 y PB25, sobre su capacidad para acumular ácido acético.

Como puede verse, las cepas PB12 y PB25, por la naturaleza de las mutaciones que portan, representaron una gran oportunidad para enfocar de un modo novedoso aquellos estudios cinéticos y metabólicos, que son necesarios para conocer a fondo aspectos fisiológicos de cepas de interés industrial. Por lo anterior, consideramos pertinente y de vital importancia para nuestro laboratorio realizar este trabajo de tesis doctoral con el fin de esclarecer las posibilidades de la ingeniería de vías metabólicas en la caracterización cinética y metabólica de microorganismos, sin perder de vista las posibilidades de estas cepas como hospederos potenciales de vehículos de expresión usados en la producción de otros metabolitos diferentes de los aminoácidos aromáticos, así como de proteínas de interés farmacológico. En este sentido, cobran especial relevancia las preguntas:

¿Cómo y en qué medida las mutaciones afectan las capacidades de estas dos cepas para producir ácido acético?

¿Existe un efecto real del fondo genético sobre la acumulación de ácido acético o es un efecto provocado por la disminución en la μ en cultivo por lote?

¿Cómo afectan las mutaciones la distribución de flujos de carbono en el metabolismo central de estas cepas?

¿Cuál es la influencia de la distribución de flujos de carbono en el metabolismo central sobre la producción de ácido acético?

Dar respuesta a estas preguntas empleando los conocimientos del estado del arte en aspectos relacionados con la ingeniería de vías metabólicas, es precisamente el motivo de este trabajo, para lo cual se establecieron los siguientes objetivos.

3.0 OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el comportamiento cinético y metabólico de cepas mutantes afectadas en el metabolismo de fosfoenolpiruvato, en relación con su capacidad para producir ácido acético

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Evaluar en cultivo por lote las diferencias en la producción de ácido acético de las cepas mutantes.

Estudiar en cultivo continuo la capacidad de producción de ácido acético de las mutantes.

Determinar los flujos de carbono intracelulares como una manera de cuantificar el efecto de las mutaciones sobre la distribución de estos flujos en el metabolismo central.

Determinar la influencia de la distribución de flujos de carbono sobre la producción de ácido acético.

Estudiar el efecto de las mutaciones sobre cinéticas de fermentación en cultivo por lote empleando un medio complejo.

4.0 GENERALIDADES

4.1 Introducción

Un cultivo típico de *Escherichia coli* creciendo sin restricciones en presencia de glucosa en un reactor completamente agitado y aireado, tiende invariablemente a acumular ácido acético (Pan, et al., 1987). Este fenómeno puede darse en un medio mínimo o complejo, (Meyer et al., 1984), se haya asociado al crecimiento y es particularmente grave cuando éste se promueve en presencia de altas concentraciones de glucosa (Marison & von-Stockar, 1986). El crecimiento característico de *Escherichia coli* en un cultivo por lote, muestra velocidades bajas de crecimiento en las primeras etapas de la propagación, las cuales se caracterizan por una nula acumulación de ácido acético; a continuación, cuando la velocidad de crecimiento rebasa cierto umbral, comienza el proceso de acumulación de ácido acético. Esta acumulación es observada, en general, a partir de la etapa temprana del crecimiento exponencial (Gschaedler et al., 1994).

La acumulación de ácido acético tiene efectos negativos de orden fisiológico, y en sistemas de fermentación industrial, de orden económico. El primer caso se presenta en el proceso de generación de energía, el cual está asociado a la membrana. Se sabe que el ácido acético es un agente lipofílico que puede penetrar a través de la membrana celular, bajando el pH interno y desacoplando el proceso de movimiento de protones a través de la membrana, afectando la producción de ATP (Luli & Strohl, 1990). Por otro lado, el hecho de que parte del carbono de la glucosa sea transformado en un subproducto que en el mejor de los casos se vuelve a metabolizar después de que el crecimiento ha cesado, es un problema que incide directamente sobre los niveles de rendimiento celular y de producto, en aquellos procesos industriales que emplean a *Escherichia coli* como parte de un sistema recombinante de producción (Lischke et al., 1993; Sun et al., 1993).

4.2 El metabolismo central en la producción de ácido acético.

El metabolismo oxidativo de *Escherichia coli*, está integrado por la vía glicolítica, el TCA y la cadena de transporte de electrones. Tanto la glicólisis como el TCA forman parte del

metabolismo central y son de naturaleza anfibia. El transporte de electrones está acoplado al funcionamiento de la vía glicolítica mediante reacciones de óxido-reducción. Las reacciones catabólicas permiten obtener a partir de la oxidación de la glucosa, la energía necesaria en forma de ATP para llevar a cabo las funciones celulares. A partir de las actividades anabólicas y suponiendo que el crecimiento se verifica en un medio mínimo, el *microorganismo adquiere los elementos necesarios para biosíntesis*. Si el microorganismo se propaga en un medio complejo, la importancia de la glucosa en funciones anabólicas se reduce considerablemente. Por lo tanto, la síntesis de macromoléculas se lleva a cabo a partir de los precursores presentes en el medio, empleándose la glucosa únicamente en funciones catabólicas (Cronan, et al., 1996; Fraenkel, 1996; Neijssel et al., 1996). Ha sido sugerido que una limitada capacidad del metabolismo oxidativo es la causa primaria de la acumulación de ácido acético, lo cual en el fondo, se traduce en una limitación en el suministro de energía en forma de ATP (Han et al., 1992; Majewski & Domach, 1990). Lo anterior sugiere que a bajas velocidades de crecimiento el metabolismo oxidativo cumple adecuadamente con los requerimientos anabólicos y catabólicos, sin embargo, cuando la velocidad de crecimiento sobrepasa cierto valor, con un aumento concomitante en la velocidad de consumo de glucosa, se presenta un desbalance entre los requerimientos metabólicos y la capacidad del metabolismo oxidativo para suministrarlos (ibídem). En una situación tal, el desborde del flujo de carbono hacia la vía de formación de ácido acético como la segunda mayor fuente de producción de ATP a nivel de sustrato, se presenta como algo inevitable (El Mansi & Holms, 1989).

Por otro lado, el análisis de diversos estudios publicados al respecto sugiere que la acumulación de ácido acético en condiciones aeróbicas es producto de la interacción de diferentes elementos integrados en el metabolismo central. Uno de estos elementos sería el proceso de transporte y fosforilación de la glucosa, el cual es llevado a cabo por PTS como un primer paso de la glicólisis. Este mecanismo es extremadamente eficiente y en teoría es capaz de concentrar la glucosa hasta 10^6 veces en contra del gradiente de concentración (Bouvet & Grimont, 1987). Asimismo, la afinidad de este sistema por la glucosa le permite desarrollar una actividad de transporte acorde con las necesidades de un crecimiento a altas

velocidades (Parr & Saier 1992). Otro elemento sería el nodo del PEP. Su función está íntimamente ligada al transporte de la glucosa por PTS, y a la transformación del PEP mediante la actividad de las piruvato cinasas. De la actividad de este nodo depende la disponibilidad del piruvato (Fraenkel, 1996). El ciclo de los TCA, tal como se ha mencionado, podría ser el componente más importante de este fenómeno, posiblemente debido a factores regulatorios o a la carencia de una actividad enzimática suficiente para oxidar el piruvato proveniente de la vía glicolítica (Majewski & Domach, 1990). Un factor determinante lo representa la vía metabólica responsable de la síntesis de ácido acético. En esta ruta, el piruvato es transformado en acetil CoA por la acción de la piruvato deshidrogenasa; a continuación, la actividad de la fosfotransacetilasa produce acetil fosfato; y finalmente el acetil fosfato junto con ADP, es transformado en ácido acético y ATP por la acción de la acetato cinasa (ver Figura 1) (Kessler & Knappe, 1996)

En este escenario, con todos estos elementos interactuando, el desborde metabólico comenzaría en el momento en que la concentración de glucosa es lo suficientemente alta para promover un crecimiento celular a altas velocidades. La actividad irrestricta de PTS con el consecuente aumento de la disponibilidad del piruvato, provocaría el desborde de la capacidad oxidativa del ciclo de los TCA. Es decir, las necesidades anabólicas y catabólicas que demanda el crecimiento, ya no serían satisfechas completamente por el ciclo de los TCA. Por ende, el microorganismo reorganizaría el metabolismo para compensar estos requerimientos. A partir de este momento, el ciclo de los TCA únicamente cumpliría funciones anabólicas, y parcialmente catabólicas y el déficit de ATP provocado por la incapacidad del ciclo de los TCA, quedaría satisfecho por medio del desvío de una porción de piruvato hacia la segunda vía alterna más importante de producción de ATP, la cual tiene también como producto final el ácido acético.

4.3 Velocidad específica de crecimiento y concentración de sustrato en la producción de ácido acético.

Ha sido ampliamente mostrado que la producción de ácido acético en *Escherichia coli* es una función de la velocidad específica de crecimiento, del tipo de medio empleado, así como de las concentraciones iniciales de la fuente de carbono (Han et al., 1992; Marison & von-Stockar, 1986; Meyer et al., 1984). Se ha determinado que en un medio mínimo, las concentraciones de glucosa mayores a 0.75 g/L estimulan la acumulación de ácido acético (Marison & Stockar, 1986). En un esquema de cultivo continuo, en el cual es posible controlar la velocidad específica de crecimiento, se ha observado que la producción de ácido acético se detecta a partir de una velocidad de 0.35 h^{-1} , punto al que se le ha dado en llamar *umbral de acumulación* (Meyer et al., 1984). Esto es cierto si se trata de un medio mínimo, sin embargo, si el medio es complejo, el umbral se desplaza hasta velocidades superiores a 0.6 h^{-1} . Desde el punto de vista del metabolismo celular, se puede decir que por debajo del umbral de acumulación, se da un balance adecuado entre las necesidades de crecimiento y la capacidad oxidativa del microorganismo (El Mansi & Holms, 1989).

4.4 Ingeniería de vías metabólicas en la producción de ácido acético.

La ingeniería de vías metabólicas es una disciplina de la biotecnología que agrupa conocimientos de ingeniería genética así como de ingeniería química. Ha sido definida como *la manipulación y evaluación integral de los procesos enzimáticos, reguladores y de transporte en los microorganismos, empleando técnicas de ingeniería genética y química con el propósito de mejorar los niveles de productividad y de rendimiento de producto* (Stephanopoulos & Sinskey, 1993). Durante muchos años, una de las principales preocupaciones de ingenieros y microbiólogos involucrados en la optimización de las fermentaciones industriales ha sido el mejoramiento de las capacidades de desempeño de los microorganismos en los reactores de producción. En este sentido, el estudio de los mecanismos por medio de los cuales los microorganismos regulan y controlan las vías biosintéticas es una de las actividades de investigación y desarrollo que más interés han

despertado. Hasta hace poco, el enfoque tradicional del mejoramiento genético consistía en la sobreexpresión individual de actividades enzimáticas y en el mejor de los casos en la desregulación parcial de algunos nodos altamente regulados (Martin et al., 1987).

Relativamente recientes, los principios y metodologías de la ingeniería de vías metabólicas contemplan a los procesos metabólicos como redes de flujos de carbono susceptibles de ser modificados y evaluados mediante el empleo de técnicas de ingeniería genética y química. Parte del sustento teórico de esta metodología, se apoya en las técnicas derivadas de la programación lineal, la cual es una disciplina empleada para el análisis y optimización de procesos industriales (Varma & Palsson, 1994). La modificación de las actividades metabólicas persigue el objetivo de alterar los flujos de carbono y energía hacia un objetivo particular, como podrían ser el incremento de la velocidad de formación de producto, o la reducción o eliminación de un subproducto celular no deseado. Las 3 etapas básicas que se contemplan para alcanzar tal objetivo son:

(a) Identificación experimental o teórica de los nodos críticos en una red metabólica que tendrían un impacto directo en la formación del producto final.

(b) Determinación del tipo exacto de modificación enzimática (es decir, amplificación, inhibición, desregulación o alguna combinación de estos aspectos) necesaria para alcanzar el resultado con un mínimo de iteraciones de ensayo y error.

(c) Evaluación del efecto de la modificación sobre la distribución del carbono en las vías metabólicas, empleando la metodología de balances de flujo de carbono.

Como parte sustantiva de la ingeniería de vías metabólicas, los balances de flujo de carbono han mostrado ser de gran utilidad para predecir y evaluar los efectos de modificaciones en las vías del metabolismo celular (Stephanopoulos, 1994; Stephanopoulos & Vallino, 1991; Varma & Palsson, 1994). Este concepto centra su atención en la representación del metabolismo en forma de una red de flujos de carbono, a partir de la cual se derivan sistemas de ecuaciones lineales que representan cada una de las reacciones que intervienen en el

metabolismo celular. La solución a este sistema de ecuaciones es una función de la estequiometría del sistema y puede evaluarse mediante el empleo de métodos estadísticos (mínimos cuadrados) o de programación lineal. Una ventaja muy importante asociada a la predicción y evaluación de los flujos de carbono metabólicos mediante balances estequiométricos, es que su cálculo es independiente de la cinética de las reacciones involucradas en las vías metabólicas (ibídem).

Los principios y metodologías de la ingeniería de vías metabólicas han sido aplicados al estudio de la producción de ácido acético, considerándolo como un producto no deseado de la actividad microbiana. Uno de los primeros trabajos publicados al respecto consistió simplemente en la interrupción de los genes *pta* y *ack*, los cuales codifican para la síntesis de las enzimas fosfotransacetilasa y acetato cinasa respectivamente, responsables de la actividad en la vía de producción de ácido acético (Diaz-Ricci et al. 1991). Las mutaciones mostraron un efecto negativo sobre el metabolismo de *Escherichia coli*, tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. No obstante que se redujo significativamente la acumulación de ácido acético, el desborde metabólico no pudo ser evitado, ya que también se observó un incremento significativo en la acumulación de ácido láctico y en la secreción de ácido pirúvico. Una alternativa que se planteó en este mismo trabajo, para reencauzar el flujo de carbono y evitar el desborde, fue la expresión del operon *pet*, el cual contiene los genes para la expresión de la piruvato descarboxilasa y la alcohol deshidrogenasa, responsables de la producción de etanol en cepas de *Zymomonas mobilis* (Ingram & Conway, 1988). Así, mediante este operón se permitió la reasimilación del ácido pirúvico durante la fermentación, para ser canalizado a la producción de etanol. Una discusión exhaustiva de los resultados obtenidos en este trabajo, permitió entrever que el desborde metabólico hacia la producción de ácido acético, no es un problema tan trivial como el hecho de interrumpir el flujo de carbono hacia la vía que promueve su acumulación. En un trabajo posterior realizado por este grupo, además de las mutaciones en *pta* y *ack*, se planteó como solución complementaria la reorientación del flujo de carbono hacia la biosíntesis de glucógeno, el cual es un material no tóxico y osmóticamente inactivo (Dedhia et al. 1994). Esto fue logrado sobreexpresando los genes *glgA* y *glgC*, responsables de la biosíntesis de

glucógeno, o mediante una mutante *glgQ*, siendo este último gene responsable de la regulación de la biosíntesis de este compuesto. En este caso se observó una reducción significativa de la acumulación de ácido acético, sin embargo, persistió la excreción de ácido pirúvico, si bien, éste fue rápidamente metabolizado durante la etapa de biosíntesis de glucógeno. Otro enfoque reportado en la literatura para reducir la acumulación de ácido acético, propuso la modificación del metabolismo central de *Escherichia coli* por medio de la expresión del gene *alsS* de *Bacillus subtilis* el cual codifica para la síntesis de la enzima acetolactato sintasa (Aristidou et al., 1994). Esta tiene como producto la acetoina, compuesto no ácido que es considerablemente menos tóxico que el ácido acético. En este trabajo se mostró que el flujo de carbono en el metabolismo central se modificó drásticamente, disminuyendo sustancialmente la concentración de ácido acético con un concomitante aumento en la concentración de acetoina. Como consecuencia de la reducción de los efectos tóxicos asociados a la presencia de ácido acético, en un trabajo posterior este grupo obtuvo un aumento de hasta 60% en la actividad específica de una proteína recombinante modelo, y hasta un 30% en la densidad celular final (Aristidou et al. 1995). Un problema que vale a pena considerar al implementar la estrategia de reorientar el flujo de carbono hacia la acumulación de compuestos menos tóxicos, tales como glucógeno o acetoina, es el compromiso de invertir una porción de la fuente de carbono en un producto adicional, que si bien no tiene ningún efecto inhibitorio sobre el crecimiento, sí lo tiene sobre los rendimientos celulares o de producto. En estos dos reportes, los experimentos fueron realizados en un medio complejo, por lo cual no hubo efecto sobre los valores de rendimiento, sin embargo, es probable que en un medio mínimo el impacto negativo sobre el rendimiento celular o de producto sea considerable. Esta consideración sería especialmente crítica en procesos de producción de metabolitos en los cuales los valores de rendimiento de producto están marcadamente sujetos a la transformación eficiente del carbono de la glucosa. Otros intentos reportados en la literatura, están relacionados con una labor de análisis de los flujos intracelulares mediante balances estequiométricos, tanto con fines de predicción, como de evaluación de los efectos de modificaciones genéticas. Los resultados teóricos obtenidos por Delgado & Liao (1997), indicaron que la excreción de ácido acético puede ser minimizada de la siguiente manera:

- (a) Reduciendo el flujo de carbono en la vía glicolítica.
- (b) Incrementando el flujo hacia la vía de las pentosas
- (c) Incrementando el flujo hacia el ciclo de los TCA (aumento de capacidad oxidativa)
- (d) Reduciendo el flujo en la vía del ácido acético.
- (e) Disminuyendo el recambio de ATP.
- (f) Incrementando el flujo de carbono en las vías anapleróticas.

El primer caso fue documentado en un trabajo anterior desarrollado por Chou et al. (1994). Inicialmente este grupo obtuvo una cepa modificada de *Escherichia coli* que portaba una mutación *ptsG*, gene que codifica para la síntesis de la enzima II de PTS. Mediante este enfoque, se logró reducir significativamente la producción de ácido acético. Sin embargo, en un medio mínimo, se observó un efecto negativo sobre la μ , aunque el efecto fue nulo en un medio complejo. A su vez, como consecuencia de esta reducción del flujo de carbono en la vía glicolítica con la subsecuente reducción en la acumulación de ácido acético, se observó un aumento de más de 50% tanto en la productividad de proteína recombinante, como en la densidad celular. El aumento del flujo de carbono hacia la vía de las pentosas como una posible solución al problema de la acumulación de ácido acético, hasta ahora no ha sido debidamente documentado. Sin embargo, estudios respirométricos llevados a cabo por Ponce et al. (1998) mostraron que la interrupción de los genes *pykA* y *pykF*, los cuales codifican para la síntesis de las dos piruvato cinasas, tuvo como efecto un incremento del flujo de carbono hacia la vía de las pentosas, con la consecuente reducción en la acumulación de ácido acético. Sin embargo, debido a una disminución en los valores de μ , en este caso no fue posible discernir si la disminución de la acumulación de ácido acético fue debida al fondo genético. El incremento en el flujo de carbono en el ciclo de los TCA, también ha sido mostrado en los experimentos realizados por Han et al. (1991). En este caso los resultados indicaron que la adición de metionina contribuyó a reducir la acumulación de

ácido acético, debido a un aumento de la capacidad oxidativa del ciclo de los TCA. No obstante, el mecanismo de este fenómeno no se conoce. Como se discutió líneas arriba, la interrupción de la vía responsable de la acumulación de ácido acético incrementó considerablemente la excreción de ácido pirúvico, aunque fue posible disminuir la acumulación de ácido acético (Diaz-Ricci et al. 1991). Por otro lado, la manipulación de los flujos involucrados en el recambio de ATP sería un proceso complejo desde el punto de vista de la identificación del paso o los pasos críticos, ya que en el cálculo de un balance de flujos típico, este recambio es una variable agrupada que incluye todas aquellas reacciones de hidrólisis de ATP en el metabolismo que no son especificadas en el balance. Por lo tanto, el trabajo de identificación de la reacción o reacciones de transformación de ATP, que tienen influencia sobre la producción de ácido acético, así como su manipulación y evaluación serían un problema difícil de manejar, sobre todo desde el punto de vista de la ingeniería genética. En el caso que implica la manipulación de los genes que codifican para la síntesis de las enzimas correspondientes a las vías anapleróticas, se han encontrado resultados interesantes. Por medio de balances de flujos, Farmer & Liao (1997) plantearon un modelo para predecir el comportamiento del flujo de carbono hacia la vía de producción de ácido acético, variando los flujos de carbono en las vías anapleróticas. Este análisis teórico mostró que aumentando el flujo de carbono hacia estas vías, podía reducir considerablemente la acumulación de ácido acético. Lo anterior quedó de manifiesto en experimentos de laboratorio posteriores, en los cuales mediante la sobreexpresión de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa y/o la desregulación de la vía del glioxilato por medio de una mutación en *fadR*, gene involucrado en la regulación de la expresión de la vía del glioxilato, se logró reducir hasta en un 70% la acumulación de ácido acético.

Como puede verse, el empleo de las herramientas agrupadas en el concepto ingeniería de vías metabólicas para reducir el proceso de acumulación de ácido acético en cepas de *Escherichia coli* ha evolucionado notablemente. En un inicio se partió de enfoques tradicionales de biología molecular, sin embargo, con el tiempo se llegó a un proceso más razonado que en algunos casos implica la identificación teórica de los pasos limitantes en el

metabolismo, la modificación de los genes responsables de éstos, y el cálculo de los flujos de carbono intracelulares para conocer los efectos de la modificación.

4.5 Las mutantes PTS⁻ y *pykApykF* y su relación con la producción de ácido acético.

Como se mencionó líneas arriba, las mutantes PB12 y PB25, son cepas que fueron creadas ex profeso con la intención de mejorar los niveles de rendimiento y productividad de aminoácidos aromáticos. En el caso de la cepa PB12, se inactivaron los genes *ptsH*, *ptsI* y *crr* del sistema fosfotransferasa, los cuales están implicados en el transporte y fosforilación de la glucosa (Flores et al. 1996). Como se sabe, este proceso involucra la participación del PEP como intermediario donador del grupo fosfato, en una secuencia de reacciones de fosforilación y desfosforilación, mismas que se muestran en la Figura 2. Es interesante hacer notar que la actividad del sistema PTS se encuentra vinculado a los procesos de regulación por inclusión del inductor y de síntesis de cAMP en el que la molécula reguladora central es la componente IIAGlc de la enzima II (EII). El primer proceso le da preferencia a un sustrato o a alguno de sus derivados, inhibiendo la actividad del sistema de transporte de otro sustrato no preferido. En el segundo caso, la regulación de los niveles de cAMP permite el control de la expresión de la síntesis de enzimas de muchos genes catabólicos. La actividad del sistema PT puede llegar a consumir más del 60% del PEP que se genera al final de la vía glicolítica (Holms, 1986). De este modo, al quedar inactivado PTS se esperaría aumentar la disponibilidad de PEP para la síntesis de aminoácidos aromáticos (Valle et al., 1996). Una vez que estas cepas fueron construidas, se realizaron experimentos de enriquecimiento y selección de mutantes espontáneas en cultivos por lote y continuo capaces de crecer empleando como única fuente de carbono a la glucosa (Flores et al., 1996). Los experimentos que se realizaron para seleccionar estas mutantes, consistieron en iniciar un cultivo por lote la mutante PTS, el cual, después de observar crecimiento, fue llevado a la fase estacionaria, a partir de la cual se comenzó la alimentación de medio para establecer un régimen continuo. Posteriormente se programaron aumentos sucesivos de velocidad de dilución con el fin de lavar del biorreactor aquellas mutantes que observaran velocidades

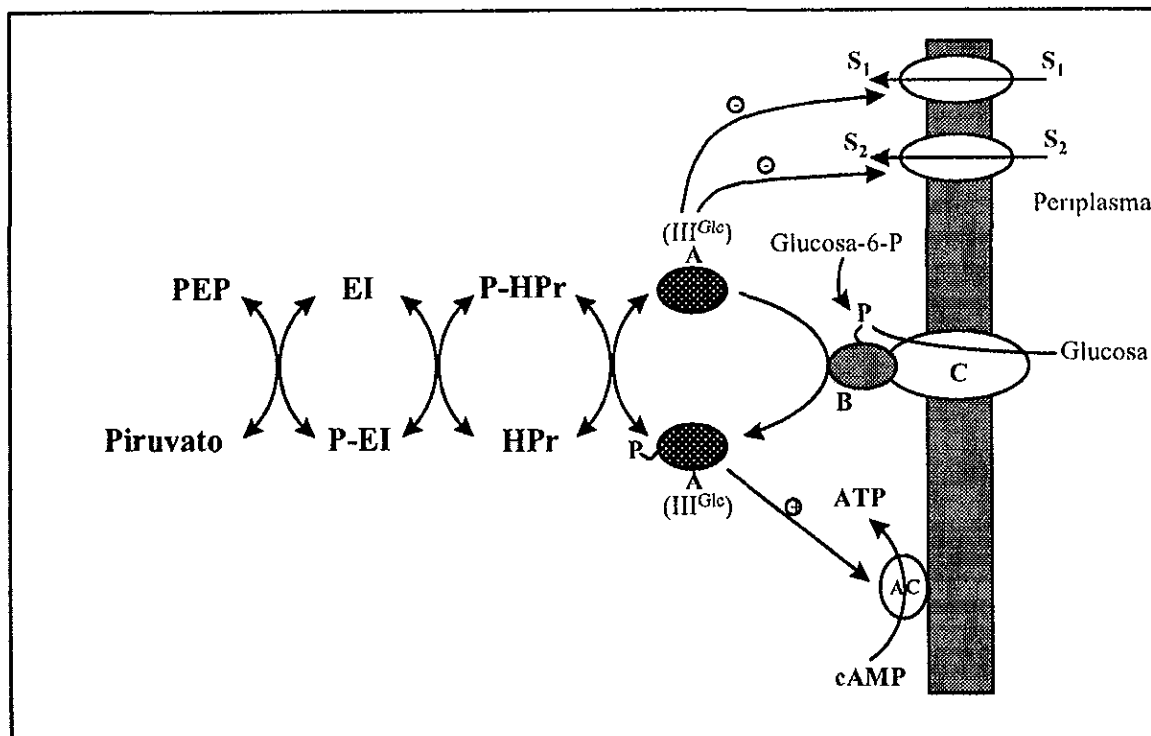


Figura 2. Representación del modelo para la fosforilación de la glucosa mediada por el sistema fosfotransferasa (PTS) y su vinculación con los procesos de regulación por exclusión del inductor y de síntesis de cAMP. EI: Enzima I; HPr: Proteína H; A, B y C: Dominios respectivos de la Enzima II (anteriormente llamada EII); S₁ y S₂: Substratos alternos no preferidos.

bajas de crecimiento, permaneciendo solo aquellas mutantes capaces de crecer a la velocidad de dilución ansayada. De este modo fue aislada la mutante PB13, la cual emplea el sistema de transporte GalP para transportar a la glucosa al interior de la célula, con la consiguiente fosforilación por medio de la glucocinasa con un gasto concomitante de ATP. Por otro lado, también con el objeto de aumentar la disponibilidad de PEP se creó una mutante con interrupciones, mediante marcadores de resistencia a antibióticos, en las isoenzimas piruvato cinasa, encargadas de transformar el PEP en piruvato (Ponce et al., 1995). Desde hace tiempo, se sabe que el piruvato generado por PTS, es suficiente para satisfacer las necesidades para biosíntesis que se dan en el ciclo de los TCA. En *Escherichia coli* silvestre existen dos piruvato cinasas con diferencias en cuanto a la actividad desplegada por cada una de ellas. Tal como lo mostraron Ponce et al. (1995), la piruvato cinasa F es la que mayor actividad presentó comparada con su isoenzima, la piruvato cinasa A. Es interesante mencionar que las mediciones de la actividad de las piruvato cinasas en fondos genéticos silvestres y PTS, mostraron una disminución de aproximadamente 40% en la actividad de la piruvato cinasa F, en relación a la observada por cepa JM101. En contraste, la actividad de la piruvato cinasa A aumentó comparativamente un 30%. Sin embargo, en este último caso el aumento no fue suficiente para compensar la pérdida en la otra enzima, ya que la actividad de la piruvato cinasa A en un fondo PTS es de 1/7 del observado por la F, y 1/15, en un fondo silvestre. Un dato de interés adicional, es que no obstante que las mutantes *pykApykF* podrían favorecer la acumulación de aminoácidos aromáticos, se ha observado que su velocidad específica de crecimiento es significativamente menor a la observada por la cepa progenitora.

Algunas de las ideas vinculadas a la producción de ácido acético con estas mutantes, partieron de reflexiones relacionadas con la modificación de la distribución de los flujos de carbono en el metabolismo central, provocados por la probable disminución de la disponibilidad de piruvato, así como de probables efectos reguladores en el metabolismo. Efectos que se esperarían dada la naturaleza de las mutaciones. En condiciones normales, la producción de piruvato para satisfacer necesidades catabólicas y anabólicas, es consecuencia de las actividades del sistema PT y las isoenzimas piruvato cinasa. En un primer

planteamiento, se pensó que estas mutaciones permitirían reducir el flujo de carbono hacia la vía de producción de ácido acético. Por otro lado, también se consideró la influencia de mecanismos reguladores en los cuales está implicado el PEP. Se conoce que el principal punto de regulación del flujo de carbono en la vía glicolítica se haya asociado a la actividad de la fosfofructocinasa, enzima alostérica cuyo efector negativo es el PEP. De este modo, se esperaría que el flujo de carbono en la vía glicolítica disminuyera al aumentar la disponibilidad de PEP en las mutantes PB12 y PB25, con el consiguiente efecto reductor en la acumulación de ácido acético. Como puede verse, en cualquier de los dos planteamientos, la lógica radica en el hecho de poder reducir los flujos de carbono en la vía glicolítica, como una manera de reducir el flujo de carbono en forma de piruvato hacia la vía que tiene como producto final el ácido acético.

5.0 MATERIALES Y METODOS

5.1 Microorganismos.

Las mutantes empleadas en este trabajo fueron construidas en nuestro laboratorio a partir de la cepa de *Escherichia coli* JM101 *supE thi Δ(lac proAB)(F' traD36 proAB lacI^qZΔM15)*. La cepa PB12 es una mutante con la siguiente característica $\Delta(ptsH-I-crr)::kan$ Glc⁺ (Flores et al. 1996); y la cepa PB25 posee a su vez la siguiente característica *pykA::kan pykF::cam* (Ponce et al. 1995).

5.2 Medios e inóculo.

En los experimentos realizados en cultivo por lote se emplearon medios mínimos y complejos. El medio mínimo fue el M9 suplementado con glucosa a razón de 2 g/L. El medio complejo se preparó a partir de un medio mínimo M9 suplementado con glucosa, al cual se le adicionó extracto de levadura a razón de 5 g/L. Los inóculos fueron preparados en medio Luria (Sambrock et al. 1989). Los cultivos iniciadores fueron preparados inoculando una asada, proveniente de un stock de células congeladas mantenido en glicerol al 10% a -70°C, en un tubo conteniendo 3 mL de LB e incubado durante la noche en una incubadora orbital G25 shaker (New Brunswick Inc. New Brunswick N.J.), a 37°C y 300 rev/min. Un mL de este cultivo fue centrifugado, y lavado dos veces con solución 10 mM de NaCl, transferido a un matraz de 500 mL con 50 mL de medio M9, y posteriormente incubado durante 12 h a 37°C y 300 rev/min. Finalmente, una porción de este cultivo fue inoculado al fermentador para alcanzar en el seno del mismo, valores de D.O. de entre 0.05 y 0.1, medidos a una longitud de onda de 600 nm.

5.3 Experimentos en fermentador.

Los experimentos en cultivo por lote y continuo, fueron realizados en un fermentador de 2 L con volúmenes de operación de 1.2 y 0.78 L respectivamente. Los datos obtenidos en los experimentos en cultivo por lote, se reportan como corridas representativas, las cuales fueron siempre comparadas, con fines de precisión, con al menos un conjunto de datos duplicados. Los experimentos en cultivo continuo, fueron iniciados a partir de cultivos por

lote cuando estos se hallaban en la fase exponencial. En las diferentes velocidades de dilución probadas, el estado estacionario se alcanzó después de transcurridos al menos seis tiempos de residencia. Se emplearon lecturas constante de q_{O_2} , q_{CO_2} , oxígeno disuelto, y densidad óptica para medir la estabilidad de los cultivos. Una vez que se hubo alcanzado el estado estacionario en cada uno de los cultivos, se tomaron 5 muestras en intervalos de 3 a 4 h cada una, para determinar las concentraciones de glucosa residual, biomasa, glucógeno y ácidos orgánicos (ver mas abajo). Las condiciones de fermentación en ambos esquemas de cultivo fueron las siguientes: Temperatura, 37°C ($\pm 0.003\%$); pH, 7 ($\pm 0.007\%$); suministro de aire, 1 VVM. El pH fue controlado por medio de la adición automática de NH_4OH 1 N. Los análisis de oxígeno y dióxido de carbono a la salida del fermentador fueron realizados en línea por medio de un espectrómetro de masas Perkin Elmer modelo MGA-1200 (Perkin-Elmer, Pomona, Calif.)

5.4 Métodos analíticos

Durante los experimentos realizado en cultivo por lote, la biomasa fue calculada a partir de mediciones de densidad óptica usando una curva de calibración (1 Unidad de $A_{600} = 0.36$ g/L. En los experimentos realizados en cultivo continuo, el peso seco fue determinado centrifugando alicuotas de 10 mL durante 10 min en una centrifuga Eppendorf (Brinkmann, Inc. Westbury, N.Y.). Los paquetes celulares fueron resuspendidos en 10 mL de una solución 10 mM y centrifugados nuevamente. Las muestras fueron llevadas posteriormente un horno de vacío y secadas durante 24 h a una temperatura de 90°C. La glucosa residual presente en el medio de cultivo, fue determinada usando un analizador enzimático Ektachem DT60 II (Kodak, Rochester, N.Y.). El glucógeno fue determinado de acuerdo con la técnica reportada por Forberg et al. (1988). Los ácidos orgánicos fueron cuantificados por medio de HPLC (Waters, Millipore Corp. Milford, Mass.) usando una columna Aminex HPX-87H de 300x7.8 mm (Bio-Rad, Hercules, Calif.) a una temperatura de 60°C, como eluyente H_2SO_4 5 mM a una velocidad de flujo de 0.5 ml/min., y empleando a su vez un detector IR 410 (Waters, Millipore Corp. Milford, Mass.)

5.5 Cálculo de flujos metabólicos.

En la ingeniería de vías metabólicas es de especial relevancia el cálculo de los flujos metabólicos intracelulares mediante balances estequiométricos. El balance se aplica en sistemas o redes metabólicas de estequiometría conocida y se realiza a partir de los flujos acumulativos obtenidos experimentalmente, tales como las velocidades de consumo de glucosa y oxígeno, así como las velocidades de producción de biomasa, CO₂ y ácidos orgánicos. El resultado de este proceso, es una representación de la distribución de los flujos de carbono en el metabolismo en un estado fisiológico particular. Una de las ventajas fundamentales de esta metodología, es que al basarse el cálculo en un balance estequiométrico, no se requiere información de las cinéticas de reacción que se dan en cada uno de los pasos que conforman una red metabólica. Una ventaja adicional, es la posibilidad de suponer a estas redes como sistemas en estado psuedoestacionario. Esta suposición es válida si se considera que los metabolitos intracelulares nos se acumulan.

5.5.1 Formulación matemática. La velocidad de acumulación de un metabolito en una red metabólica, está dada por la suma de todas las reacciones que lo producen menos la suma de todas las reacciones que lo consumen:

$$r_i(t) = \sum_j \alpha_j x_j(t) - \sum_k \alpha_k x_k(t) \quad (1)$$

donde: $x_j(t)$ es la velocidad o flujo a través de la reacción j , α_j es un coeficiente estequiométrico y $r_i(t)$ es la velocidad de acumulación del metabolito i . El sistema de ecuaciones que resulta de este balance, construido para cada metabolito en la red de bioreacciones metabólicas, puede representarse en notación matricial como sigue:

$$A\mathbf{x}(t) = \mathbf{r}(t) \quad (2)$$

En donde A es una matriz $m \times n$ de coeficientes estequiométricos, $\mathbf{x}(t)$ es el vector de flujos n -dimensional y $\mathbf{r}(t)$ es el vector de acumulación de metabolitos m -dimensional. La solución

por mínimos cuadrados a esta ecuación de red de biorreacciones (2), siempre y cuando $m > n$ y A sea de rango completo, está dada por:

$$\mathbf{x}(t) = (\mathbf{A}^T \Psi^{-1} \mathbf{A})^{-1} \mathbf{A}^T \Psi^{-1} \mathbf{r}(t) \quad (3)$$

en donde Ψ es una matriz de covarianzas de *ruido* de las mediciones asociadas con \mathbf{r} , y los superíndices denotan cantidades medidas y estimadas, respectivamente.

Los elementos de $\mathbf{r}(t)$ están divididos en los subvectores $\mathbf{r}_E(t)$ y $\mathbf{r}_I(t)$, los cuales corresponden a los metabolitos extracelulares e intracelulares respectivamente. Los elementos del vector $\mathbf{r}_E(t)$, se obtienen a partir de la pendiente calculada entre dos puntos consecutivos de los datos de concentración en una cinética en cultivo por lote, o directamente de las mediciones tomadas en el estado estacionario en un cultivo continuo. Considerando la suposición de un estado pseudoestacionario para los metabolitos intracelulares, los elementos del vector $\mathbf{r}_I(t)$ se ajustan a 0.

5.5.2 Programa BIONET. Este es un programa que fue desarrollado para facilitar la construcción y el análisis de redes de biorreacciones metabólicas, y para estimar las distribuciones de flujos en dichas redes a partir de mediciones experimentales.

El programa consiste de cuatro menús principales, los cuales típicamente se ejecutan de una manera secuencial.

Menú 1. Muestra el estatus de las variables del sistema, y permite al usuario cambiar de drives o directorios.

Menú 2. En esta opción se construye la ecuación de la red de biorreacciones (BRNE). Esto se puede hacer manualmente o a partir de los archivos bioquímicos definidos por el usuario.

Menú 3. Esta opción se usa para analizar posibles problemas de **singularidad** o **sensibilidad** en la **BRNE**, así como para construir la matriz empleada en los análisis posteriores de **consistencia**.

Menú 4. Este menú permite al usuario la construcción **del vector de mediciones**, checar la **consistencia de las mediciones** y para estimar los **flujos metabólicos** de la **BRNE**.

5.5.3 Implementación del programa. No obstante que en los párrafos siguientes se describe en esencia como se debe operar el programa, esta descripción dista de ser completa, por lo que para mayores detalles se debe acudir la manual del usuario. En dicho manual se describen algunos fundamentos, así como los detalles finos asociados a la operación. Lo que aquí se expone y el manual del usuario, son hasta cierto punto complementarios.

Para el análisis de los flujos en la **BRNE**, básicamente se ejecutan dos secuencias de iteración principales (ver Figura 3).

1.- La primera consiste en la construcción y análisis de la **BRNE**, de tal manera que la matriz final sea **no singular** y este bien **posicionada**. Esto se lleva a cabo por medio de los Menús 1 a 3. En este momento aún no se alimentan al programa las mediciones.

2.- En la segunda se construye y checa la **consistencia** del vector inicial de mediciones. Una vez que se tiene un vector consistente, se estiman los flujos a partir de un nuevo vector de mediciones actualizado, el cual es producto del vector inicial. El proceso se repite para cada vector de mediciones. La ejecución de esta segunda secuencia recae predominantemente en las opciones del Menú 4.

5.5.4 Construcción de la red de biorreacciones (BRNE). Una vez que se construyen los archivos bioquímicos (.**BIO**) y de metabolitos (.**CMP**), se inicializa el programa.

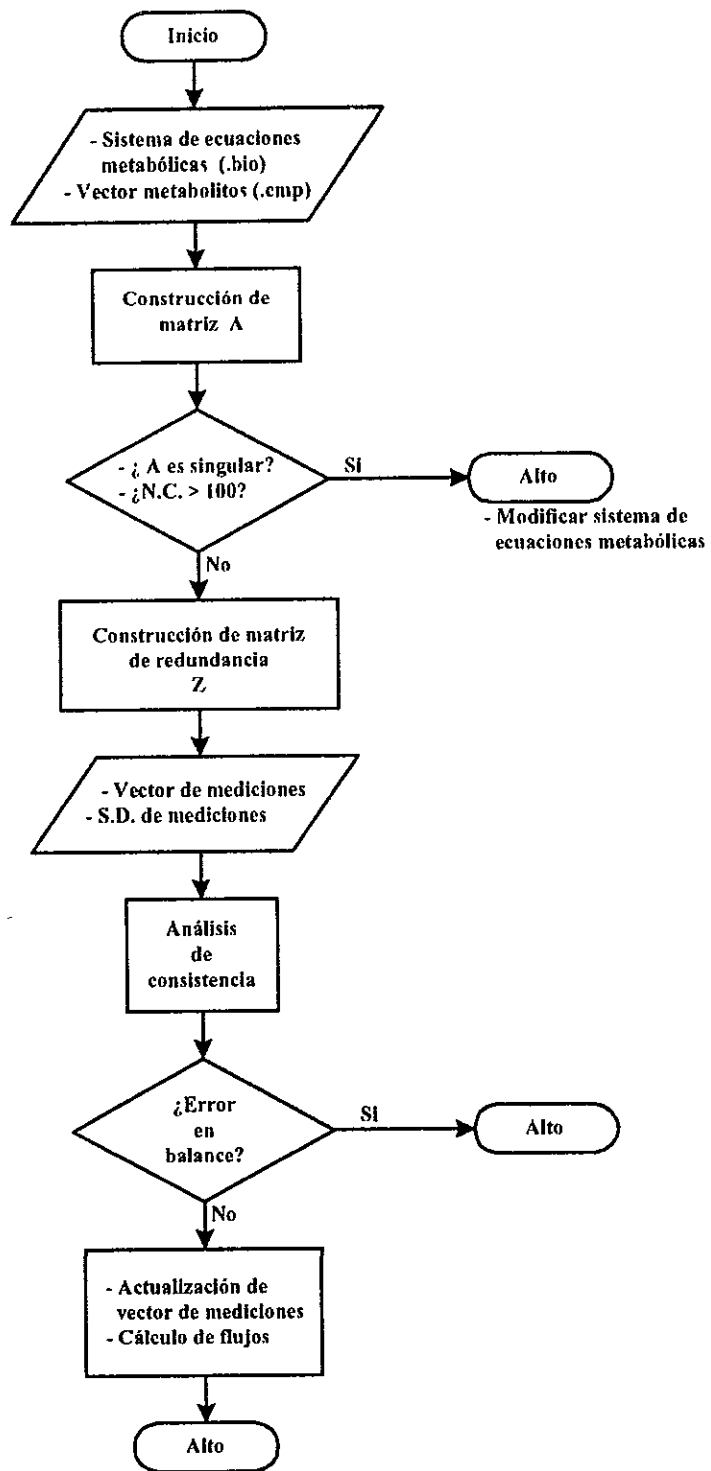


Figura 3. Diagrama de flujo de la secuencia de operaciones principales ejecutadas por el programa BIONET.

La opción 1 del Menú 2, se emplea para construir la matriz bioquímica **A** y la matriz de restricciones **C** y **b**, estas dos últimas, sean o no usadas. La opción 4 del Menú 2, se usa para guardar el sistema en un archivo **.ACB**, nombrado por el usuario.

Las opciones dentro del Menú 3, se usan para examinar la matriz bioquímica, **A**. La opción 2 de este menú se usa para análisis de singularidad de la matriz. Si **A** es singular, se puede, si así se desea, examinar la matriz **U** después de que esta fue guardada en un archivo **.UP**; en esta se identifican los grupos singulares que confieren la singularidad de **A**. Si se obtiene una matriz singular, se deben editar los archivos **.BIO** y **.CMP**, ya sea borrando o agrupando las reacciones planteadas, con el fin de remover las singularidades en **A**. Para esto se debe salir del programa. Este proceso se repite cuantas veces sea necesario hasta obtener una **BRNE** no singular. Una vez que esto se alcanza, se usa la opción 3 para calcular el número de condición de **A**. Si el número de condición es inaceptable (alrededor de 1000 o mas), entonces los archivos bioquímicos deben ser modificados nuevamente hasta obtener un número de condición aceptable (aproximadamente 100 o menos). La rutina de sensibilidad detallada (opción 4), también puede ser usada para identificar aquellas mediciones que pueden introducir problemas de sensibilidad. Finalmente, una vez que los archivos bioquímicos han sido modificados, de tal manera que ahora se tiene una matriz **A** no singular y bien posicionada, se emplea la rutina de singularidad (opción 2) para construir la matriz de redundancia **Z**, a partir de la cual se Esta matriz se guarda en un archivo **.Z** con la opción 6. Con esto queda concluido en la primera secuencia de iteraciones.

5.5.5 Estimación de flujos. Una vez que ha sido construida una matriz bioquímica a partir de los archivos **.BIO** y **.CMP**, y esta ha resultado no singular y bien posicionada, se estiman los flujos metabólicos a partir de las mediciones. Como primer paso, a partir de los datos experimentales puntuales o intervalos de tiempo específicos, se calculan las velocidades específicas de acumulación de metabolitos, así como sus desviaciones estándar asociadas. Una vez realizado esto, se inicia nuevamente el programa. Como se mencionó anteriormente el Menú 1 se usa para asignar directorios. La opción 5 del Menú 2 y la 5 del Menú 3 se usan para cargar los archivos **.ACB** y el de redundancia **.Z**, los cuales fueron previamente

guardados en la primera secuencia de iteraciones. Las opciones 2-5 del Menú 4 se usan para alimentar los datos de velocidades específicas y la opción 6 para guardar dichos datos (vector \mathbf{r}). Una vez hecho esto, se invoca la rutina de redundancia. En la opción 3 del Menú 4.8 se alimentan los datos correspondientes a las desviaciones estándar de las mediciones (normalmente, solo se conocen las desviaciones estándar de los metabolitos que fueron medidos experimentalmente, en consecuencia, al resto de las mediciones usualmente se les asigna una desviación estándar pequeña pero aceptable). La opción 6 del Menú 4.8 es empleada para reducir las mediciones, de tal manera que solo aquellos metabolitos que fueron medidos quedan activos. A continuación de esta reducción, la opción 4 se emplea para iniciar el análisis automático de error. Si el conjunto de mediciones pasa el análisis de consistencia (sin eliminaciones), entonces la opción 8 se emplea para salir de la rutina de redundancia y actualizar el vector de mediciones. Si el conjunto de mediciones es inconsistente, pero la inconsistencia puede ser removida eliminando una medición, entonces la medición se elimina (o su desviación estándar aumentada) y a continuación se sale de la rutina por medio de la opción 8, tal y como se mencionó arriba. Si el conjunto de mediciones es inconsistente, y la inconsistencia no puede ser removida eliminando una medición, entonces todo el conjunto de mediciones es guardado nuevamente vía la opción 6 y la rutina automática de análisis de consistencia empezada otra vez. Si la inconsistencia puede ahora ser removida eliminando una medición previamente removida, entonces la opción 8 se emplea una vez más para actualizar el vector de mediciones. Finalmente, si la inconsistencia no puede ser removida legítimamente, entonces el empleo del vector de mediciones, queda cuestionado. Si durante las rutinas surgen inconsistencias que no pueden ser identificadas, entonces existe una probabilidad muy alta de que las ecuaciones bioquímicas puedan ser erróneas o existe algún metabolito acumulándose que no se está considerando en el conjunto de mediciones. Cabe hacer notar que el hecho de eliminar una medición, es una medida más bien drástica. En consecuencia, una alternativa sería el incrementar la desviación estándar de las mediciones cuestionables a un nivel aceptable antes de invocar la eliminación de una medición. Como puede notarse, para el uso de la rutina de redundancia se requiere cierta experiencia; sin embargo, una vez que ha logrado dominarse, esta técnica es muy poderosa para identificar mediciones cuestionables y eliminarlas con fundamento.

Una vez que es obtenido el vector de mediciones actualizado en la rutina de redundancia, las opciones 9-13 del menú 4 se emplean para calcular los flujos y guardar los resultados. Los flujos estimados pueden ser examinados saliendo del BIONET al DOS. El proceso que se describió líneas arriba, se repita para cada vector de mediciones, r .

5.5.6 Miscelánea. En algunas ocasiones se presenta la necesidad de estimar los flujos de un conjunto de mediciones incompleto. Por ejemplo, el oxígeno y el CO₂, pudieron no haberse medido en alguna corrida en particular. Por lo tanto, aquellas mediciones que no fueron realizadas, se remueven del balance en el archivo .CMP, anteponiendo el carácter “!” en la columna uno del registro que corresponde al metabolito no medido. El número de metabolitos que pueden ser eliminados del archivo .CMP esta dado por $m-n$. Una vez que se ha modificado el archivo .CMP, el sistema de ecuaciones debe ser recheado para identificar problemas de singularidad y sensibilidad, tal y como se describió líneas arriba, ya que el eliminar mediciones, puede introducir singularidades aún si $m > n$. Este procedimiento de eliminación, también puede ser usado para calcular distribuciones de flujo teóricas. Visto de manera simple, los metabolitos se eliminan del archivo .CMP hasta que la matriz bioquímica, A , sea cuadrada ($m=n$). En este punto, a las mediciones remanentes se les asignan valores arbitrarios, de tal modo que no surjan inconsistencias (desde luego, A debe ser no singular). Por lo tanto, se pueden examinar distribuciones de flujos teóricas para cualquier vector de mediciones definido arbitrariamente.

5.6 Estrategia experimental.

En la Figura 4, se presenta la estrategia experimental que se planteó alcanzar los objetivos de este trabajo.

1.- Experimentos en cultivo por lote en medio mínimo. Se generó información a partir de experimentos en cultivo por lote realizados con la cepa progenitora (JM101) y con las dos mutantes (PB12 y PB25) en un medio mínimo, empleando como única fuente de carbono a

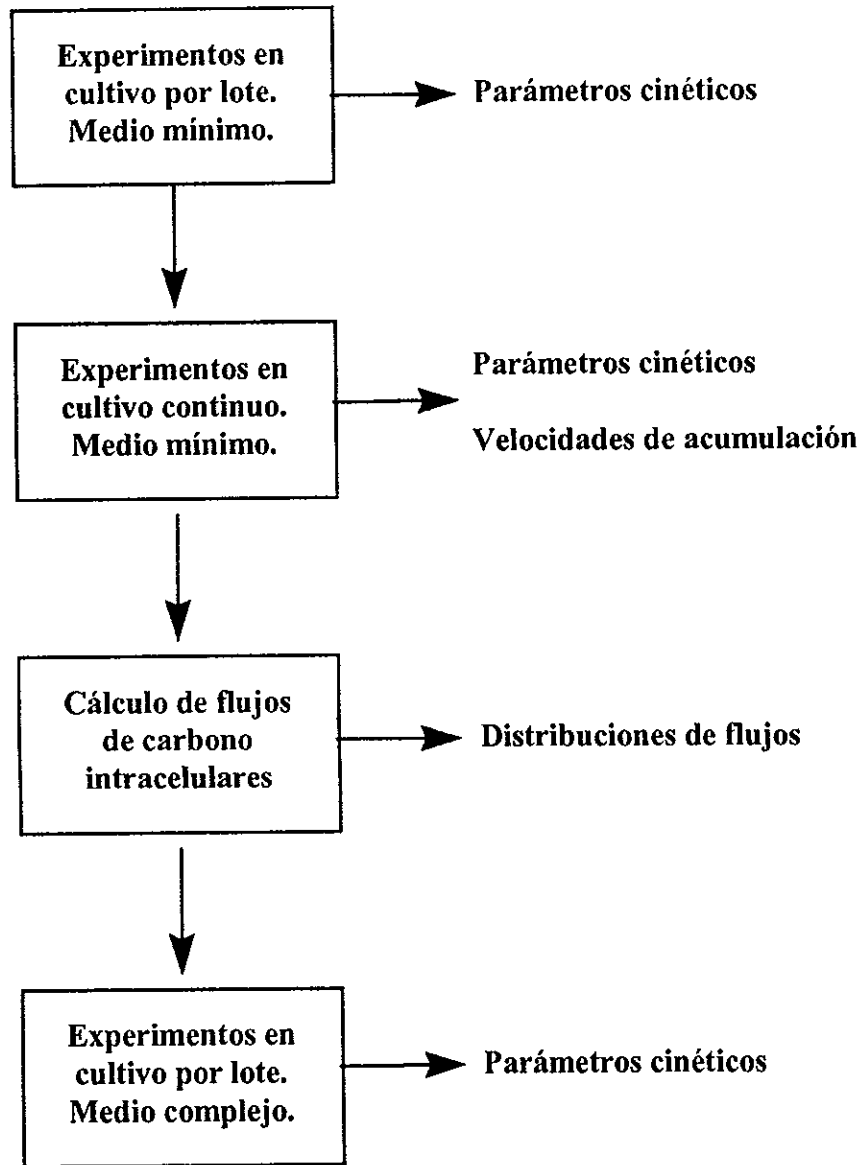


Figura 4. Esquema representativo de la estrategia experimental planteada para alcanzar los objetivos propuestos en este trabajo.

la glucosa. Se obtuvieron diferentes parámetros de fermentación, tales como μ , $Y_{X/S}$, $Y_{HAc/X}$, q_s y q_{HAc} .

2.- Experimentos en cultivo continuo en medio mínimo. Este conjunto de datos se generó en experimentos en régimen continuo en un medio mínimo empleando como única fuente de carbono a la glucosa. En este caso además de los parámetros cinéticos tales como $Y_{X/S}$, $Y_{HAc/X}$, q_s , q_{O_2} y q_{CO_2} , se recopilaron velocidades acumulativas de metabolitos extracelulares con el fin de alimentar el programa BIONET para el cálculo de flujos de carbono intracelulares.

3.- Cálculo de flujos de carbono. El conjunto de datos correspondiente al cálculo de la distribución de flujos se obtuvo empleando el programa BIONET, el cual se describe brevemente en esta sección. En este caso se obtuvieron datos de distribución de flujos de carbono en el metabolismo central.

4. Experimentos en cultivo por lote en medio complejo. Los datos correspondientes a estos experimentos se generaron a partir de cultivos por lote realizados en un medio complejo, compuesto de glucosa como fuente de carbono y extracto de levadura como fuente de aminoácidos y cofactores. Se obtuvieron diferentes parámetros de fermentación, tales como μ , $Y_{X/S}$, $Y_{HAc/X}$, q_s y q_{HAc} . En este caso se evaluó en términos cinéticos, la pertinencia de emplear estas cepas como hospederos en sistemas recombinantes.

6.0 RESULTADOS

Durante el desarrollo de este trabajo, se llevaron a cabo distintos experimentos con el fin de esclarecer la naturaleza cinética y metabólica de las mutantes PB12 y PB25, particularmente en relación con su capacidad para acumular ácido acético. No obstante que los experimentos en cultivo por lote en medio mínimo y complejo no fueron secuenciales, en un primer subcapítulo se describen juntos, en vista de que forman parte de un mismo esquema de cultivo. En otro subcapítulo se describen los experimentos que se realizaron en cultivo continuo empleando un medio mínimo. En un subcapítulo posterior se describe el análisis de los flujos de carbono intracelulares con datos experimentales obtenidos en cultivo continuo.

6.1 Experimentos en cultivo por lote. Medios mínimo y complejo.

Con el fin de evaluar y comparar los parámetros de crecimiento de la cepa JM101 y de las dos mutantes PB12 y PB25 afectadas en el metabolismo de PEP, se realizaron experimentos en cultivo por lote en medios mínimo y complejo. En la Figura 5 y 6 se presentan los perfiles de crecimiento, consumo de glucosa, así como los niveles de acumulación de ácido acético observados por los cultivos. Como puede verse, en medio mínimo las tres cepas exhibieron diferentes velocidades de crecimiento; adicionalmente la cepa PB25 alcanzó un nivel de concentración de biomasa ligeramente mas bajo al mostrado por otras cepas JM101 y PB12. Por otro lado, en un medio complejo las concentraciones finales de biomasa fueron similares para las tres cepas (ver Figura 6). Es interesante hacer notar en este caso, que las cepas PB12 y PB25 alcanzaron la misma velocidad de crecimiento, si bien, fue menor a la observada por la JM101. Tanto en medio mínimo como en medio complejo, se pudieron observar diferencias con relación al consumo de glucosa en cada una de las tres cepas; adicionalmente, en los dos medios, los niveles de acumulación de ácido acético así como su consumo subsiguiente fue sustancialmente diferente. En medio mínimo, con las cepas JM101 y PB25, el consumo de ácido acético se presentó después de que casi toda la glucosa había sido agotada y el crecimiento había cesado; por el contrario, con la cepa PB12 el ácido acético solo se detectó en una etapa tardía del crecimiento y nunca acumuló más de 0.05 g/L. En medio complejo, el consumo de ácido acético con la cepa JM101, solo se dio cuando la glucosa fue completamente

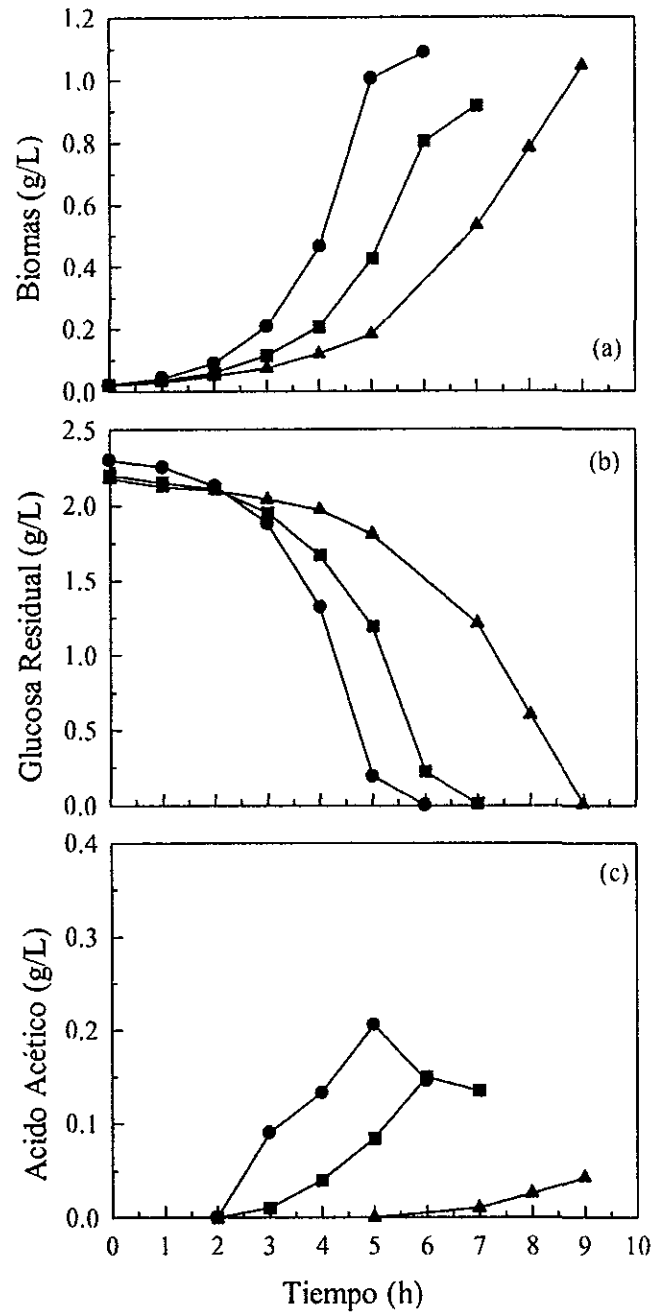


Figura 5. Perfiles de crecimiento, consumo de glucosa y acumulación de ácido acético de las tres cepas de *E. coli* ensayadas en cultivo por lote empleando el medio M9 suplementado con glucosa (2 g/L). Símbolos: (●) JM101; (▲) PB12; (■) PB25.

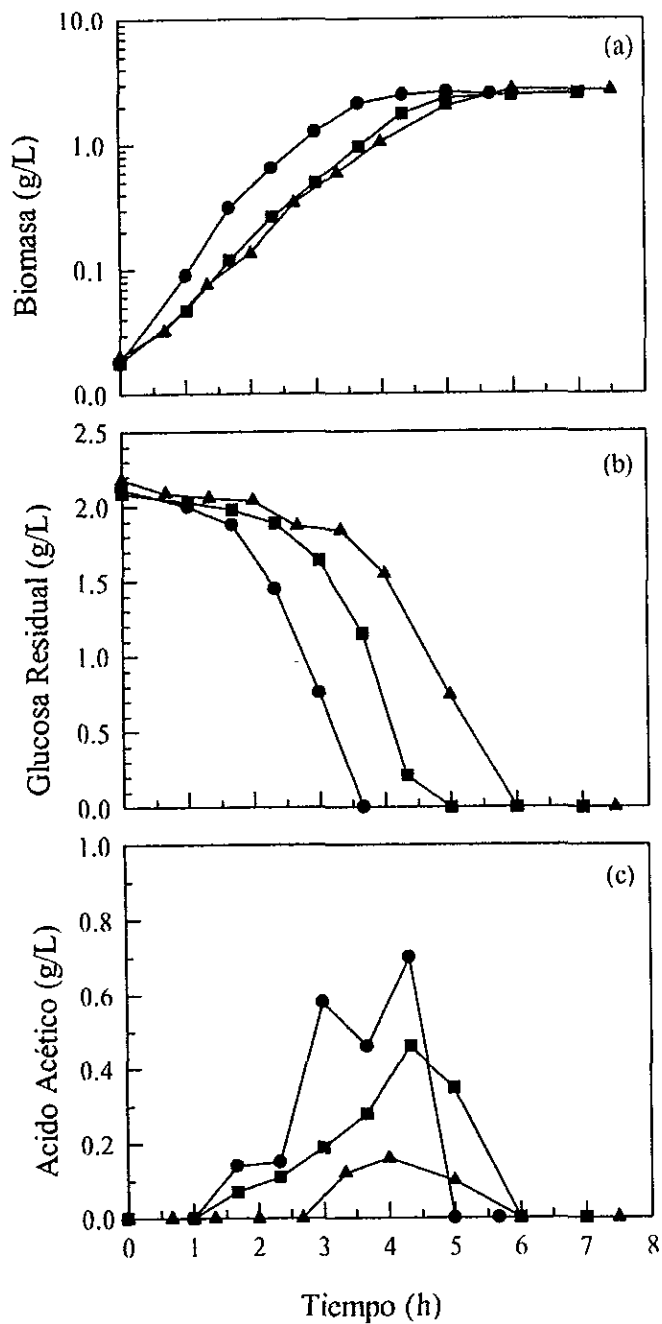


Figura 6. Perfiles de crecimiento, consumo de glucosa y acumulación de ácido acético de las tres cepas de *E. coli* ensayadas en cultivo por lote usando medio M9 suplementado con glucosa (2 g/l), y extracto de levadura (5 g/L). Símbolos: (●) JM101; (▲) PB12; (■) PB25.

agotada, en cambio con las cepas PB12 y PB25, el ácido acético fue consumido aun en presencia de glucosa. En ambos medios de cultivo no se detectaron concentraciones significativas de otros ácidos orgánicos (láctico, pirúvico y succínico). Por otro lado, la presencia de carbohidratos de reserva en forma de glucógeno, solo fue detectada en medio complejo, aunque su concentración nunca fue mayor de 40 ppm. (datos no mostrados). Es interesante destacar que no obstante haber observado velocidades específicas de crecimiento similares en un medio complejo, las cepas PB12 y PB25 mostraron patrones de consumo de glucosa y acumulación de ácido acético sustancialmente diferentes. Estas diferencias sugieren comparativamente un consumo más eficiente de la glucosa por parte de la cepa PB12.

Los datos generados por estas cinéticas de crecimiento, fueron utilizados para calcular rendimientos y velocidades específicas de crecimiento, mismos que se muestran en las Tablas 1 y 2. En medio mínimo la más alta μ fue obtenida con la cepa JM101, mientras que las cepas PB12 y PB25 mostraron una disminución de 40 y 20% respectivamente comparadas con la observada por la cepa JM101. De igual manera en un medio complejo la más alta μ fue alcanzada por la cepa JM101, mientras que las cepas PB12 y PB25 mostraron una disminución de 25% con relación a la alcanzada por la JM101 (ver Tabla 2). Los rendimientos celulares más altos tanto en medio mínimo como complejo fueron alcanzados por la cepa PB12, lo cual estuvo en concordancia con el hecho de haber observado los más bajos niveles de acumulación y rendimiento de ácido acético en ambos medios de cultivo. En medio mínimo la cepa PB12 observó un aumento de 14% en el rendimiento celular comparado con el observado por la cepa JM101, y la cepa PB25 observó una disminución de 15%. En medio complejo, los valores de rendimiento celular entre las cepas JM101 y PB25 fueron similares, en tanto que el correspondiente a la cepa PB12 observó un aumento de 58% con relación al observado por la cepa JM101. Es interesante destacar el comportamiento de la cepa PB25, el cual, a pesar de haber acumulado una cantidad menor de ácido acético mostró, comparados con el observado por la JM101, niveles más bajos de rendimiento celular en medio mínimo y similares en medio complejo, reflejándose también en un mayor rendimiento de ácido acético en medio mínimo. Esto sugiere que cuando la cepa

Tabla 1. Resumen de resultados de los ensayos realizados en cultivo por lote en medio mínimo con las tres cepas de *Escherichia coli*^a.

Cepa	μ_{\max} (h ⁻¹)	^b Y _{X/S} (g/g)	^b Y _{HAc/X} (g/g)	^c q _S (g g ⁻¹ h ⁻¹)	^c q _{HAc} (g g ⁻¹ h ⁻¹)
JM101	0.78	0.47	0.14	1.67	0.112
PB12	0.47	0.54	0.064	0.87	0.03
PB25	0.62	0.4	0.197	1.54	0.121

^aEstos parámetros se obtuvieron a partir de los datos de una corrida representativa y fueron comparados, para fines de precisión, con los datos de cuando menos un duplicado

^bRendimientos de biomasa con base en el sustrato consumido, y de producción de ácido acético con base en la biomasa producida, calculados de los datos de la fase exponencial

^cVelocidades específicas de consumo de glucosa y de producción de ácido acético, calculados a partir de los datos de la fase exponencial.

Tabla 2. Resumen de resultados de los ensayos en cultivo por lote en medio complejo realizados con las tres cepas de *Escherichia coli*^a.

Cepa	μ_{\max} (h ⁻¹)	^b Y _{X/S} (g/g)	^b Y _{HAc/X} (g/g)	^c q _S (g g ⁻¹ h ⁻¹)	^c q _{HAc} (g g ⁻¹ h ⁻¹)
JM101	1.4	1	0.24	1.56	0.34
PB12	1.1	1.58	0.21	0.66	0.22
PB25	1.1	1	0.25	1.1	0.28

^aLos cálculos fueron realizados a partir de los datos de una corrida representativa y comparados con fines de precisión con los datos de al menos un duplicado.

^bRendimientos de biomasa con base en la glucosa consumida y rendimiento de ácido acético por biomasa producida; calculados de datos obtenidos en la fase de crecimiento exponencial.

^cVelocidades específicas de consumo de glucosa y producción de ácido acético, calculados a partir de los datos en la fase de crecimiento exponencial

PB25 se propaga en medio mínimo, una cantidad comparativamente mayor de fuente de carbono es desviada a otras rutas metabólicas, en lugar de a la formación de biomasa. En este sentido, ha sido observado que la cantidad total de CO₂ producido con la cepa PB25 fue superior al observado por las otras cepas (datos no mostrados). En concordancia con estos resultados, ha sido mostrado previamente que la vía de las pentosas en la cepa PB25 incrementa sustancialmente su participación en el catabolismo de la glucosa (Ponce et al., 1998).

Se observaron diferentes valores de consumo específico de glucosa y producción de ácido acético. Como se esperaba, en medio mínimo la velocidad específica de consumo de glucosa más alta fue observada por la cepa JM101, en tanto que las observadas por las cepas PB12 y PB25, representaron una disminución del 50% y 10% respectivamente. De igual modo, en medio complejo la velocidad específica de consumo de glucosa más alta fue alcanzada por la cepa JM101, mientras que las cepas PB12 y PB25 mostraron una disminución de 58 y 30% respectivamente en comparación a la observada por la cepa JM101. En relación con la producción de ácido acético, en medio mínimo la cepa PB25 mostró un aumento en la velocidad específica de producción de ácido acético de cerca de 10% comparada con la mostrada por la cepa JM101, mientras que la cepa PB12 observó comparativamente una disminución de más del 70%. En medio complejo la cepa JM101 mostró la más alta velocidad específica, en contraste, las cepas PB12 y PB25, mostraron una disminución de 35 y 18% respectivamente.

En la literatura se ha puntualizado que la acumulación de ácido acético en cultivos de *Escherichia coli* es una función directa de la velocidad específica de crecimiento (El-Mansi and Holms, 1989; Meyer et al., 1984). Es interesante destacar que en términos de acumulación tanto la cepa PB12 como la PB25, mostraron un comportamiento consistente con este enunciado en ambos medios de cultivo, sin embargo, en términos de rendimiento esto no fue el caso para la cepa PB25, probablemente debido a una mayor producción de acetato por unidad de biomasa, comparada con las otras cepas. Por otro lado, si bien los experimentos realizados en cultivo por lote dan información cinética importante, a partir de

dicha información no es posible diferenciar entre el efecto del fondo genético de aquel provocado por la μ . Por lo tanto, con el fin de indagar con mayor profundidad en cuanto a las diferencias en la acumulación de ácido acético de estas cepas, se realizaron experimentos en cultivo continuo limitados por glucosa. Esto permitió obtener información en el estado estacionario a diferentes velocidad de dilución (velocidad de dilución = μ) para cada cepa y medir las velocidades de acumulación de ácido acético bajo estas condiciones.

6.2 Experimentos en cultivo continuo.

Considerando que las mutaciones incorporadas a las cepas PB12 y PB25 involucraron al transporte de la glucosa, el metabolismo de PEP y la disponibilidad de piruvato, el primer parámetro que se quiso estudiar fue el rendimiento celular (ver Figura 7a). En el intervalo de velocidades de dilución ensayadas, la cepa JM101 mostró una ligera disminución a medida que la velocidad de crecimiento se incrementó, desde 0.38 hasta 0.35 g de células/g de glucosa consumida. Este comportamiento fue mas pronunciado con la cepa PB25, ya que la disminución fue desde un valor de 0.47 hasta 0.33 gramos de células/g de glucosa consumida, mientras que con la cepa PB12, se observó un incremento del rendimiento celular con la velocidad de dilución desde 0.31 hasta 0.39 g de células/g de glucosa consumida.

Como se mencionó antes, otro parámetro de interés para este trabajo fue el rendimiento de acetato producido en condiciones de estado estacionario. Como se puede apreciar en la Figura 7b, ninguna de las tres cepas produjo acetato a velocidades de dilución de 0.2 y 0.3 h⁻¹. Sin embargo a una velocidad de dilución de 0.35 h⁻¹ tanto la cepa PB12 como la PB25 acumularon ácido acético. Este dato es congruente con el umbral de acumulación de ácido acético reportado en la literatura en un medio mínimo (Meyer et al., 1984). El rendimiento de ácido acético a esta velocidad de dilución con la cepa PB12 fue 40% mas bajo que el obtenido por la cepa JM101. Es interesante destacar que a esta velocidad de dilución la cepa PB25 no acumuló ácido acético. En contraste, las tres cepas produjeron ácido acético a una

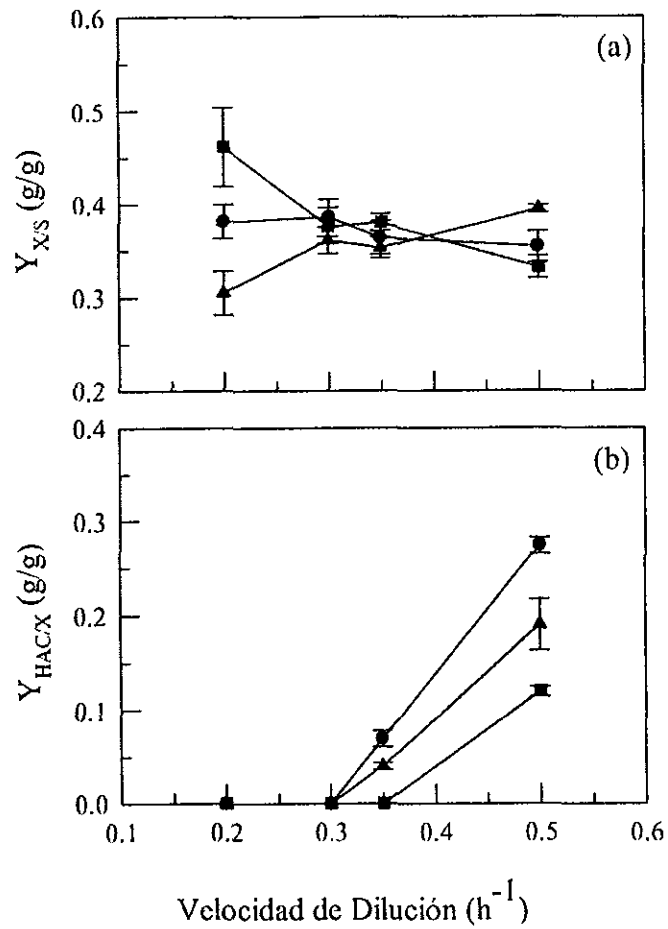


Figura 7. Comportamiento de los rendimientos celular y de ácido acético en función de la velocidad de dilución de las tres cepas de *E.coli* cultivadas en medio M9 suplementado con glucosa (2 g/L). Símbolos: (●) JM101; (▲) PB12; (■) PB25.

velocidad de dilución de 0.5 h^{-1} , sin embargo, a esta velocidad de dilución y comparadas con la cepa JM101, las cepas PB12 y PB25 produjeron 30 y 50% respectivamente menos ácido acético. Es importante mencionar que las cepas examinadas bajo estas condiciones, no mostraron una acumulación significativa de otros ácido orgánicos (láctico, pirúvico y succínico), o la acumulación de material de reserva en forma de glucógeno (datos no mostrados).

Como se esperaba, la velocidad específica de consumo de glucosa aumentó a medida que la velocidad de dilución se incrementó, si bien, cada cepa mostró una pendiente diferente (ver Figura 8a). De acuerdo con la Figura 8b, la velocidad específica de producción de CO_2 mostró un aumento lineal en función de la velocidad de dilución. A una velocidad de dilución de 0.2 h^{-1} y comparada con la cepa JM101, la cepa PB12 mostró una velocidad específica de producción de CO_2 ligeramente mayor, en contraste, a una velocidad de dilución de 0.5 h^{-1} , este valor fue significativamente mas bajo. Cabe mencionar que si bien algunas variaciones son descritas en este texto como *ligeras*, desde un punto de vista estadístico merecen ser destacadas, de acuerdo con los datos de desviación estándar mostrados en las gráficas. Con la cepa PB25 a una velocidad de dilución de 0.2 h^{-1} , la velocidad específica de producción de CO_2 observada fue significativamente mas baja que la observada por la cepa JM101, mientras que a una velocidad de dilución de 0.5 h^{-1} , fue similar a la mostrada por la cepa JM101. En relación con la producción específica de consumo de oxígeno, como se esperaba, las cepas JM101 y PB25 mostraron un incremento lineal en función de la velocidad de dilución. Sin embargo, la velocidad específica de consumo de oxígeno observada por la cepa PB25 a una velocidad de dilución de 0.2 h^{-1} , fue significativamente menor a la observada por la cepa JM101, en contraste, a una velocidad de dilución de 0.5 h^{-1} , se observaron valores similares. Sorpresivamente la cepa PB12 mostró una velocidad específica de consumo de oxígeno casi constante en las diferentes velocidad de dilución probadas. Es interesante destacar que las diferencias mostradas en las velocidades específicas de producción de CO_2 y de consumo de oxígeno para las cepas probadas, claramente muestran diferentes actividades metabólicas oxido-reductoras.

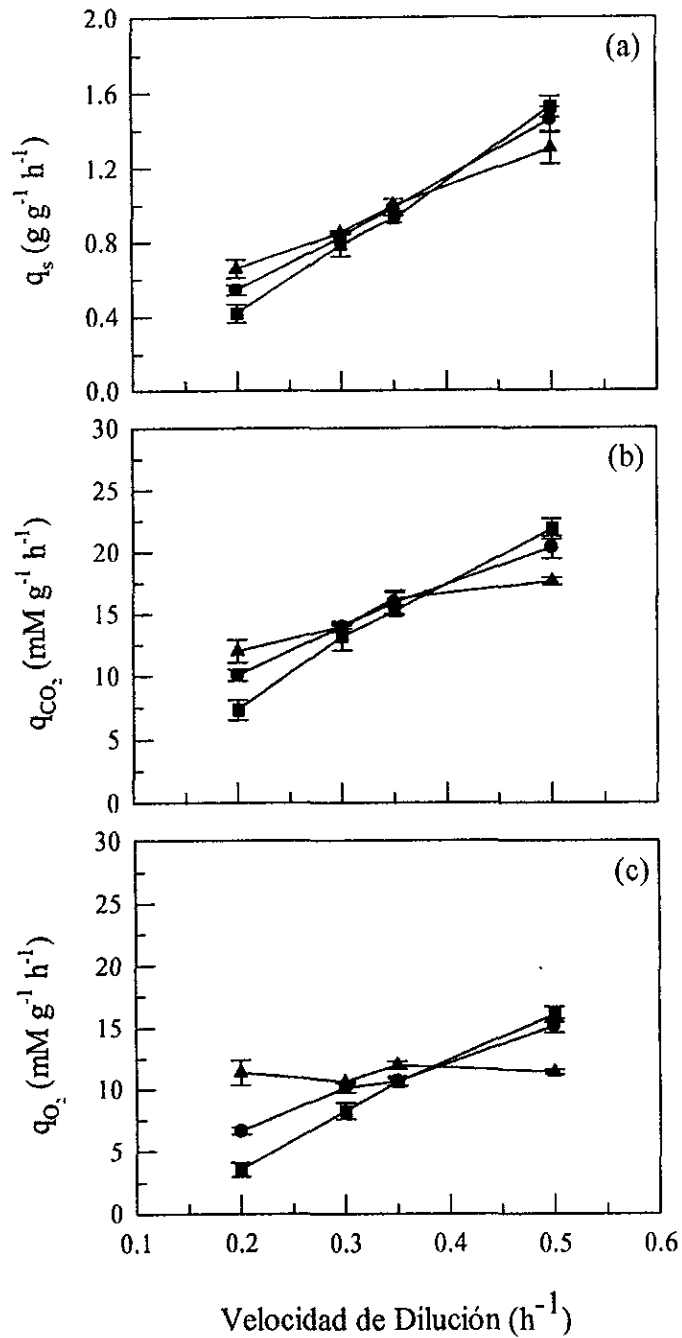


Figura 8. Comportamiento de las velocidades específicas de consumo de glucosa, producción de CO_2 y consumo de oxígeno de las tres *E. coli* cultivadas en medio M9 suplementado con glucosa (2 g/L). Símbolos: (●) JM101; (▲) PB12; (■) PB25.

6.3 Análisis de flujos intracelulares.

Tal como se discutió líneas arriba, un paso importante en la metodología de ingeniería de vías metabólicas, consiste en la evaluación de los flujos de carbono intracelulares. Con la finalidad de examinar el comportamiento de estos flujos en las mutantes afectadas en el metabolismo de PEP, así como la forma en que estos influyeron en la acumulación de ácido acético, se realizó el cálculo de su distribución en el metabolismo central. Los cálculos se llevaron a cabo aplicando la metodología de balance de flujos, para lo cual se emplearon las mediciones acumulativas obtenidas en experimentos en cultivo continuo, a diferentes velocidades de dilución. En el capítulo de Materiales y Métodos, se describen esta metodología, así como algunas características del programa BIONET, el cual fue empleado para realizar los cálculos.

La Figura 9 muestra un esquema general con las reacciones que integran el metabolismo central de *Escherichia coli* (Cronan & LaPorte, 1997; Fraenkel, 1997; Kessler & Knappe, 1997). Derivados de este esquema, en las Tablas 3, 4, 5 y 6 se muestran para las tres cepas, los sistemas de ecuaciones metabólicas, así como el vector de metabolitos (el mismo para las tres cepas), empleados para alimentar al programa BIONET. Las 27 reacciones mostradas en dichos sistemas también representan los flujos de carbono desconocidos. A partir de este conjunto de datos, se obtuvieron las matrices estequiométricas A con soluciones únicas, junto con dos redundancias para las pruebas de consistencia (datos no mostrados). En los sistemas de ecuaciones correspondientes a las cepas JM101 y PB25, se especifica a PTS como mecanismo de transporte y fosforilación, mientras que en el correspondiente a la cepa PB12, se especifica la actividad GalP y glucocinasa, como mecanismos de transporte y fosforilación respectivamente, con un gasto concomitante de ATP (ver Tablas 3, 4 y 5). En el sistema de ecuaciones correspondiente a la PB25, junto a la interrupción en la reacción catalizada por las piruvato cinasas, se agregó una reacción que indica la actividad de la transhidrogenasa. Esta última enzima sería responsable de transformar en NADH cualquier exceso de NADPH producido en el metabolismo (más adelante se abundará sobre este punto). En la reacción correspondiente a la acumulación de biomasa, especificada en las ecuaciones metabólicas, se muestran las demandas de

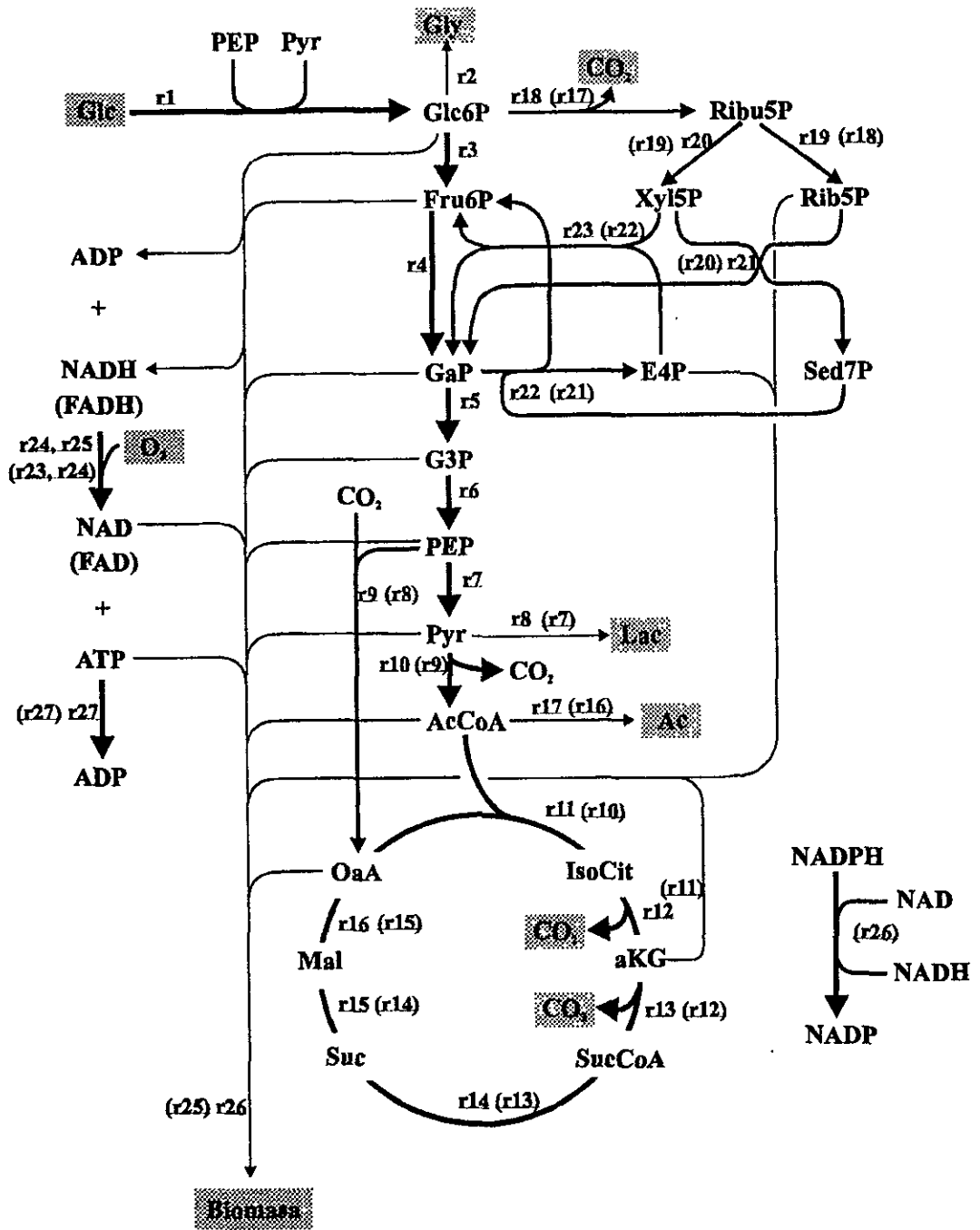


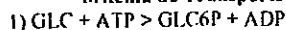
Figura 9. Representación esquemática parcial del metabolismo central de *Escherichia coli*. En la cepa JM101, la fosforilación y transporte de la glucosa (r1) se lleva a cabo por PTS y empleando PEP en el proceso; en la cepa PB12, la reacción 1 (r1) se lleva a cabo empleando GalP y glucocinasa para transporte y fosforilación respectivamente. Los números entre paréntesis representan la continuidad de las reacciones en la cepa PB25 sin la reacción que corresponde al paso de PEP a piruvato. R26 representa la inclusión de la actividad de transdeshidrogenasa en la red metabólica de la cepa PB25.

Tabla 3. Sistema de ecuaciones metabólicas representativas el metabolismo central de *Escherichia coli* JM101.

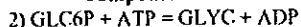
<p>! Sistema de Transporte (PTS) 1) $GLC + PEP > PYR + GLC6P$</p> <p>! Componente de reserva: Glucógeno 2) $GLC6P + ATP = GLYC + ADP$</p> <p>! Vía de Embden-Meyerhof-Parnas 3) $GLC6P = FRU6P$ 4) $FRU6P + ATP > 2 GAP + ADP$ 5) $GAP + ADP + NAD > NADH + G3P + ATP$ 6) $G3P = PEP + H2O$ 7) $PEP + ADP > ATP + PYR$ 8) $PYR + NADH = LAC + NAD$</p> <p>! Reacciones de carboxilación y relacionadas con el piruvato 9) $PEP + CO2 > OAA$! $OAA + ATP > PEP + CO2 + ADP$! $MAL + NADP > PYR + CO2 + NADPH$! $MAL + NAD = OAA + NADH$! $PYR + COA > ACCOA + FORM$! $FORM > CO2 + H2O$</p> <p>! Ciclo TCA 10) $PYR + COA + NAD > ACCOA + CO2 + NADH$ 11) $ACCOA + OAA + H2O = ISOCIT + COA$ 12) $ISOCIT + NADP = AKG + NADPH + CO2$ 13) $AKG + COA + NAD > SUCCOA + CO2 + NADH$ 14) $SUCCOA + ADP = SUC + COA + ATP$ 15) $SUC + H2O + FAD = MAL + FADH$ 16) $MAL + NAD = OAA + NADH$</p> <p>! Producción y consumo de ácido acético ! Acetato cinasa y acetilfosfotransferasa agrupadas 17) $ACCOA + ADP = AC + COA + ATP$</p> <p>! Vía del glioxilato ! $ISOCIT = SUC + GLYOX$! $ACCOA + GLYOX + H2O > MAL + COA$</p> <p>! Vía de las pentosas 18) $GLC6P + H2O + 2 NADP > RIBU5P + CO2 + 2 NADPH$ 19) $RIBU5P = RIB5P$ 20) $RIBU5P = XYL5P$ 21) $XYL5P + RIB5P = SED7P + GAP$ 22) $SED7P + GAP = FRU6P + E4P$ 23) $XYL5P + E4P = FRU6P + GAP$</p> <p>! Producción de ATP: P/O = 2 24) $2 NADH + O2 + 4 ADP > 2 H2O + 4 ATP + 2 NAD$ 25) $2 FADH + O2 + 2 ADP > 2 H2O + 2 ATP + 2 FAD$</p> <p>! Producción de biomasa ! Suposición MW(Biomasa) = 100 ! C4.07 H7.13 O1.55 N1.02 plus 5.00% ceniza 26) $.021 GLC6P + .007 FRU6P + .09 RIB5P + .036 E4P + .013 GAP + .15 G3P + .072 PEP &$ $Cont: + 283 PYR + .294 ACCOA + .179 OAA + .108 AKG + 1.778 ATP + 1.689 NADPH + 355 &$ $cont: NAD = BIOMAS + 1.78 ADP + 1.689 NADP + .355 NADH + .227 CO2$</p> <p>! Requerimientos de ATP no especificados ! $NAD + NADPH = NADH + NADP$ 27) $ATP > ADP$</p>	<p>Nota: (1) Las expresiones antecedidas por el signo !, el BIONET los considera comentarios y no son tomadas en cuenta para el proceso de cálculo.</p>
--	---

Tabla 4. Sistema de ecuaciones metabólicas que representan el metabolismo central de *Escherichia coli* PB12.

! **Sistema de Transporte: GalP + glucocinasa**



! **Componente de reserva: Glucógeno**



! **Via de Embden-Meyerhof-Parnas**

- 3) $GLC6P = FRU6P$
 4) $FRU6P + ATP > 2 GAP + ADP$
 5) $GAP + ADP + NAD > NADH + G3P + ATP$
 6) $G3P = PEP + H2O$
 7) $PEP + ADP > ATP + PYR$
 8) $PYR + NADH = LAC + NAD$

! **Reacciones de carboxilación y relacionadas con el piruvato**

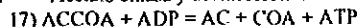
- 9) $PEP + CO2 > OAA$
 ! $OAA + ATP > PEP + CO2 + ADP$
 ! $MAL + NADP > PYR + CO2 + NADPH$
 ! $MAL + NAD = OAA + NADH$
 ! $PYR + COA > ACCOA + FORM$
 ! $FORM > CO2 + H2O$

! **Ciclo TCA**

- 10) $PYR + COA + NAD > ACCOA + CO2 + NADH$
 11) $ACCOA + OAA + H2O = ISOCIT + COA$
 12) $ISOCIT + NADP = AKG + NADPH + CO2$
 13) $AKG + COA + NAD > SUCCOA + CO2 + NADH$
 14) $SUCCOA + ADP = SUC + COA + ATP$
 15) $SUC + H2O + FAD = MAL + FADH$
 16) $MAL + NAD = OAA + NADH$

! **Producción y consumo de ácido acético**

! **Acetato cinasa y acetilfosfotransferasa agrupadas**



! **Via del glioxilato**

- ! $ISOCIT = SUC + GLYOX$
 ! $ACCOA + GLYOX + H2O > MAL + COA$

! **Via de las pentosas**

- 18) $GLC6P + H2O + 2 NADP > RIBU5P + CO2 + 2 NADPH$
 19) $RIBU5P = RIB5P$
 20) $RIBU5P = XYL5P$
 21) $XYL5P + RIB5P = SED7P + GAP$
 22) $SED7P + GAP = FRU6P + E4P$
 23) $XYL5P + E4P = FRU6P + GAP$

! **Producción de ATP: P/O = 2**

- 24) $2 NADH + O2 + 4 ADP > 2 H2O + 4 ATP + 2 NAD$
 25) $2 FADH + O2 + 2 ADP > 2 H2O + 2 ATP + 2 FAD$

! **Producción de biomasa**

! **Suposición MW(Biomasa) = 100**

! **C4.07 H7.13 O1.55 N1.02 plus 5.00% ceniza**

- 26) $.021 GLC6P + .007 FRU6P + .09 RIB5P + .036 E4P + .013 GAP + .15 G3P + .072 PEP +$
 $Cont: +.283 PYR + .294 ACCOA + .179 OAA + 108 AKG + 1.778 ATP + 1.689 NADPH + .355 \&$
 $cont: NAD = BIOMAS + 1.78 ADP + 1.689 NADP + 355 NADH + .227 CO2$

! **Requerimientos de ATP no especificados**

- ! $NAD + NADPH = NADH + NADP$
 27) $ATP > ADP$

Nota: (1) Las expresiones anteceditas por el signo !, el BIONET los considera comentarios y no son tomadas en cuenta para el proceso de cálculo.
 (2) La expresión sombreada representa el sitio de la mutación

Tabla 5. Sistema de ecuaciones metabólicas representativas del metabolismo central de *Escherichia coli* PB25.

- ! **Sistema de Transporte (PTS)**
1) $GLC + PEP > PYR + GLC6P$
- ! **Componente de reserva: Glucógeno**
2) $GLC6P + ATP = GLYC + ADP$
- ! **Via de Embden-Meyerhof-Parnas**
3) $GLC6P = FRU6P$
4) $FRU6P + ATP > 2 GAP + ADP$
5) $GAP + ADP + NAD > NADH + G3P + ATP$
6) $G3P = PEP + H2O$
! $PEP + ADP > ATP + PYR$
7) $PYR + NADH = LAC + NAD$
- ! **Reacciones de carboxilación y relacionadas con el piruvato**
8) $PEP + CO2 > OAA$
! $OAA + ATP > PEP + CO2 + ADP$
! $MAL + NADP > PYR + CO2 + NADPH$
! $MAL + NAD = OAA + NADH$
! $PYR + COA > ACCOA + FORM$
! $FORM > CO2 + H2O$
- ! **Ciclo TCA**
9) $PYR + COA + NAD > ACCOA + CO2 + NADH$
10) $ACCOA + OAA + H2O = ISOCIT + COA$
11) $ISOCIT + NADP = AKG + NADPH + CO2$
12) $AKG + COA + NAD > SUCCOA + CO2 + NADH$
13) $SUCCOA + ADP = SUC + COA + ATP$
14) $SUC + H2O + FAD = MAL + FADH$
15) $MAL + NAD = OAA + NADH$
- ! **Producción y consumo de ácido acético**
! **Acetato cinasa y acetilfosfotransferasa agrupadas**
16) $ACCOA + ADP = AC + COA + ATP$
- ! **Via del glicoxilato**
! $ISOCIT = SUC + GLYOX$
! $ACCOA + GLYOX + H2O > MAL + COA$
- ! **Via de las pentosas**
17) $GLC6P + H2O + 2 NADP > RIBU5P + CO2 + 2 NADPH$
18) $RIBU5P = RIB5P$
19) $RIBU5P = XY1.5P$
20) $XYL5P + RIB5P = SED7P + GAP$
21) $SED7P + GAP = FRU6P + E4P$
22) $XYL5P + E4P = FRU6P + GAP$
- ! **Producción de ATP: P/O = 2**
23) $2 NADH + O2 + 4 ADP > 2 H2O + 4 ATP + 2 NAD$
24) $2 FADH + O2 + 2 ADP > 2 H2O + 2 ATP + 2 FAD$
- ! **Producción de biomasa**
! **Suposición MW(Biomasa) = 100**
! **C4.07 H7.13 O1.55 N1.02 plus 5.00% ceniza**
25) $.021 GLC6P + .007 FRU6P + .09 RIB5P + .036 E4P + .013 GAP + .15 G3P + .072 PEP +$
 $Cont: +.283 PYR + .294 ACCOA + .179 OAA + .108 AKG + 1.778 ATP + 1.689 NADPH + .355$ &
 $cont: NAD = BIOMAS + 1.78 ADP + 1.689 NADP + .355 NADH + 227 CO2$
- ! **Requerimientos de ATP no especificados**
26) $NAD + NADPH = NADH + NADP$
27) $ATP > ADP$

Nota: (1) Las expresiones anteceditas por el signo !, el BIONET los considera comentarios y no son tomadas en cuenta para el proceso de cálculo.
(2) La expresión sombreada representa el sitio de la mutación.

Tabla 6. Representación del vector columna de metabolitos involucrados en los sistemas de ecuaciones de las tres cepas de *Escherichia coli*.

- 1) AC
- 2) ACCOA
- 3) AKG
- 4) ATP
- 5) BIOMAS
- 6) CO2
- 7) E4P
- 8) FADH
- 9) FRU6P
- 10) G3P
- 11) GAP
- 12) GLC
- 13) GLC6P
- 14) GLYC
- 15) ISOCIT
- 16) LAC
- 17) MAL
- 18) NADH
- 19) NADPH
- 20) O2
- 21) OAA
- 22) PEP
- 23) PYR
- 24) RIB5P
- 25) RIBU5P
- 26) SED7P
- 27) SUC
- 28) SUCCOA
- 29) XYL5P

precursores básicos para la síntesis celular, las cuales fueron obtenidas a partir de los datos indicados en la Tabla 7.

En la Tabla 8 se muestran las mediciones acumulativas obtenidas experimentalmente en cultivo continuo para cada una de las cepas, así como sus respectivas desviaciones estándar. Cada medición representa el promedio de cinco muestras tomadas en el estado estacionario. Así mismo, se muestran las velocidades de acumulación estimadas por el BIONET. Los estimados son el resultado de un ajuste (considerando el error experimental), que el programa realiza para satisfacer completamente el balance de masa que se desprende de la estequiometría del sistema de ecuaciones metabólicas. Como se esperaba, los estimados de velocidades acumulativas obtenidas por el programa, fueron muy similares a los obtenidos experimentalmente, a consecuencia de los reducidos valores de desviación estándar de las mediciones experimentales. En este sentido, cabe señalar que el programa genera una función de prueba llamado índice de consistencia (h) a partir del cual realiza un análisis estadístico comparando esta función en una distribución de X^2 . Esta prueba se realiza en primer lugar para medir la consistencia del vector de mediciones experimentales, lo cual a su vez permite la identificación de grandes errores en las mediciones experimentales, y en segundo lugar para conocer la validez de las ecuaciones metabólicas propuestas, o la posible existencia de otro metabolito extracelular que no se midió. Los valores bajos de h , permitieron el pase de la prueba estadística con un nivel de confianza de 90%. Cabe mencionar que los balances de carbono realizados de modo independiente, dieron resultados satisfactorios, con porcentajes de recuperación de carbono de alrededor del 100%. Se debe mencionar también que el contenido de carbono en la biomasa es un dato obtenido de la literatura y se supuso igual en cada una de las velocidades de dilución probadas. Por otro lado, durante las rutinas de cálculo se detectaron ligeras incoherencias en los flujos correspondientes al ciclo de los TCA. Para darle prioridad al balance de carbono sobre el flujo de energía, las inconsistencias se eliminaron mediante la exclusión, durante el análisis, de la reacción catalizada por la succinato deshidrogenasa, la cual tiene como productos el malato y FADH. Bien visto, no se esperaría un efecto significativo sobre los flujos de carbono o incluso sobre el flujo de energía, ya que no existe pérdida de carbono en este punto, y la contribución al balance energético, en relación con la

Tabla 7. Demanda de metabolitos para la fomación de biomasa en *Escherichia coli*.

PRECURSOR	DEMANDA DEMANDA ^b		PRODUCTOS
	(μ M/g biom.)	(M/M Biom)	
GLC6P	204.9500	0.0205	
FRU6P	70.9000	0.0071	
RIB5P	897.7000	0.0898	
E4P	361.0000	0.0361	
GAP	129.0000	0.0129	
G3P	1493.1000	0.1493	
PEP	719.1000	0.0719	
PYR	2832.8000	0.2833	
ACCOA	2938.1200	0.2938	
OAA	1786.7000	0.1787	
AKG	1077.9000	0.1078	
ATP	17775.8700	1.7776	
ADP			1.7776
CO2			0.2268
NAD	3547.3000	0.3547	
NADH			0.3547
NADPH	16886.0800	1.6886	
NADP			1.6886

^bEl peso molecular de la biomasa fue normalizado a 100

Tabla 8. Velocidades experimentales de producción de metabolitos ($\text{mM L}^{-1} \text{h}^{-1}$) y sus desviaciones estándar obtenidas en cultivo continuo con diferentes cepas, así como las mediciones estimadas por BIONET.

		Velocidad de dilución (h^{-1})							
		0.2		0.3		0.35		0.5	
Cepa	Medición (mM/L/h)	Experimental	Estimado	Experimental	Estimado	Experimental	Estimado	Experimental	Estimado
JM101	Biomasa	2.1 ± 0.098	2.09	2.5 ± 0.067	2.5	2.65 ± 0.13	2.67	3.75 ± 0.174	3.75
	Glucosa	-3.053 ± 0.008	-3.05	-3.59 ± 0.007	-3.59	-4.05 ± 0.008	-4.05	-5.88 ± 0.013	-5.88
	Acetato	0	0	0	0	0.31 ± 0.03	0.31	1.71 ± 0.081	1.72
	CO ₂	10.2 ± 0.02	10.2	10.95 ± 0.132	11	11.76 ± 0.21	11.8	14.8 ± 0.046	14.8
	O ₂	6.734 ± 0.123	-6.73	7.94 ± 0.15	-7.94	7.9 ± 0.23	-7.88	11.03 ± 0.153	-11
PB12	Biomasa	1.33 ± 0.104	1.35	2.29 ± 0.025	2.3	2.66 ± 0.081	2.66	2.7 ± 0.045	2.7
	Glucosa	-2.42 ± 0.008	-2.42	-3.53 ± 0.001	-3.53	-4.18 ± 0.009	-4.18	-3.91 ± 0.189	-3.89
	Acetato	0	0	0	0	0.18 ± 0.011	0.18	0.86 ± 0.013	0.86
	CO ₂	7.95 ± 0.046	7.95	-10.45 ± 0.02	-10.4	12.18 ± 0.031	12.2	9.54 ± 0.031	9.54
	O ₂	-7.51 ± 0.195	-7.58	-7.95 ± 0.043	-7.95	-8.99 ± 0.109	-8.99	-6.16 ± 0.023	-6.16
PB25	Biomasa	1.7 ± 0.193	1.64	2.3 ± 0.181	2.39	2.69 ± 0.068	2.69	3.37 ± 0.122	3.37
	Glucosa	-2.12 ± 0.002	-2.12	-3.4 ± 0.009	-3.4	-3.92 ± 0.015	-3.92	-5.63 ± 0.004	-5.63
	Acetato	0	0	0	0	0	0	0.67 ± 0.03	0.67
	CO ₂	6.71 ± 0.074	6.71	10.25 ± 0.021	10.3	11.61 ± 0.035	11.6	14.55 ± 0.04	14.6
	O ₂	-3.24 ± 0.203	-3.24	-6.43 ± 0.017	-6.44	-8.08 ± 0.043	-8.08	-10.7 ± 0.026	-10.7

Los valores negativos que se muestran en la tabla representan el suministro de estos nutrientes en el balance general.

producción de energía asociada al NADH, no sería significativa. También es importante mencionar que en el análisis de los flujos, se emplearon de manera razonada diferentes esquemas metabólicos, lo cual incluyó (a) la inserción de la reacción de la transhidrogenasa en los esquemas correspondientes a las cepas JM101 y PB12, (b) la expresión de la ruta anaplerótica del glioxilato en las tres cepas, (c) la expresión de la vía de Entner Doudoroff en las cepas PB12 y PB25, y (d) diversas alternativas para eliminar las inconsistencias mencionadas en el ciclo de los TCA. Sin embargo, en las diversas alternativas que se ensayaron, se obtuvieron flujos metabólicos incoherentes o imposibles, o bien, matrices A singulares (sin solución), por lo cual fueron eliminadas del proceso de cálculo.

Las soluciones obtenidas por el BIONET pueden estar dadas en flujos relativos, los cuales representan la fracción o porcentaje de carbono que fluye a través de una reacción en particular. Esta normalización se expresa en términos de la primera reacción, correspondiente a la fosforilación de la glucosa considerándola como el 100%. En las Figuras 10-21 se muestran las *instantáneas* del metabolismo celular, para cada una de las tres cepas a diferentes velocidades de dilución. Un vistazo general a estas figuras permite ver los cambios, significativos en algunos casos, de los flujos de carbono en el metabolismo central. Son de particular interés los cambios observados en los flujos de carbono de la vía de las pentosas y del ciclo de los TCA a medida que la velocidad de dilución aumenta, tanto en la cepa JM101 como en las cepas mutantes. Líneas abajo se discutirá mas a detalle el comportamiento de los flujos de carbono en términos de aquellas reacciones que son representativas del comportamiento en una determinada vía metabólica. Sin embargo, es interesante poner de relieve la capacidad de esta herramienta, mediante el empleo de esquemas que representan la distribución de flujos de carbono en el metabolismo central en un estado fisiológico particular. Esto es de particular interés para conocer cabalmente las diferencias en cuanto a las actividades metabólicas de un microorganismo, especialmente cuando su metabolismo se encuentra alterado por mutaciones tales como las que portan las cepas PB12 y PB25.

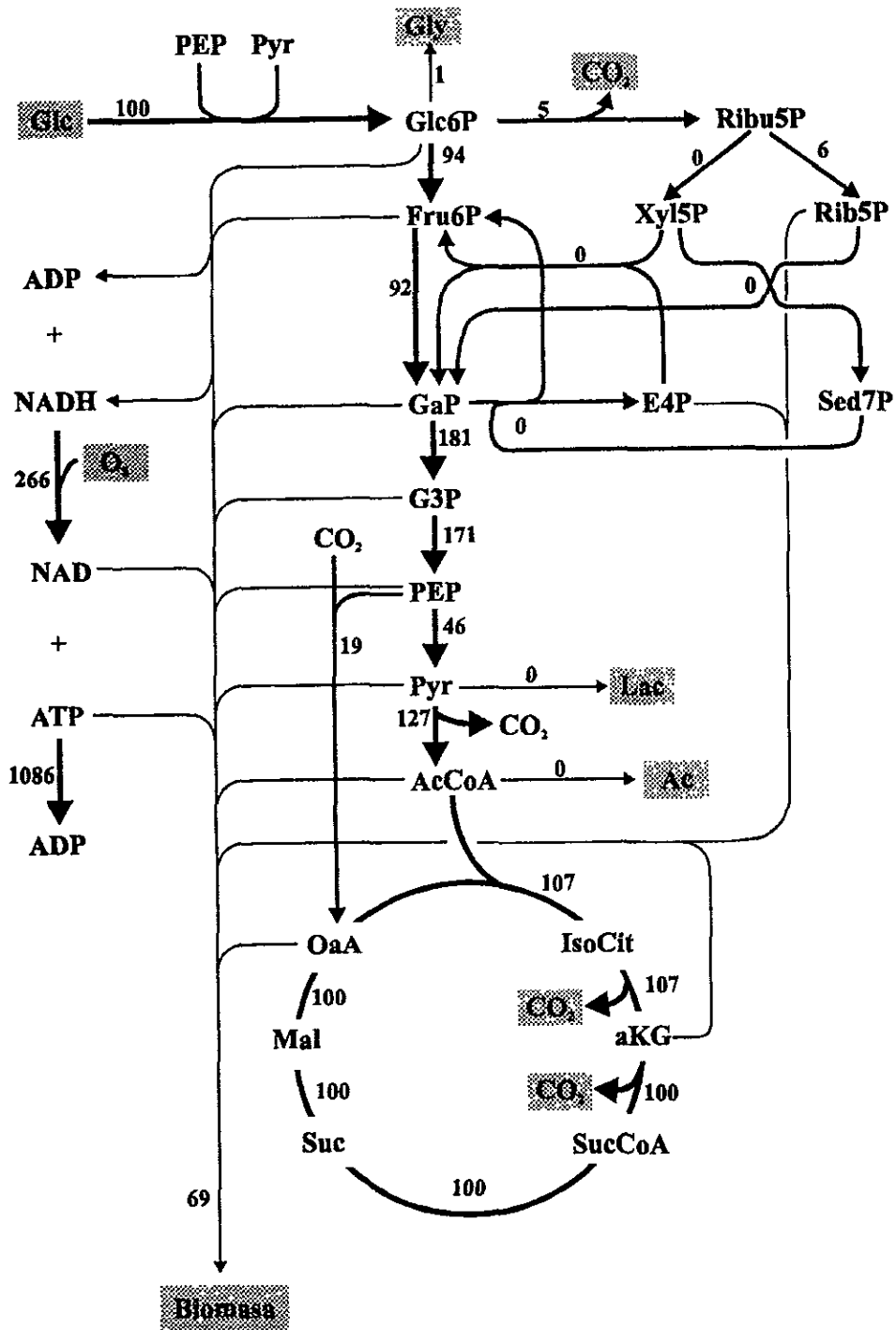


Figura 10. Distribución de los flujos de carbono intracelular de *E. coli* JM101 ensayada en cultivo continuo a una velocidad de dilución de 0.2 h^{-1} . Los flujos están normalizados al flujo de entrada de la glucosa, considerando a éste como el 100%.

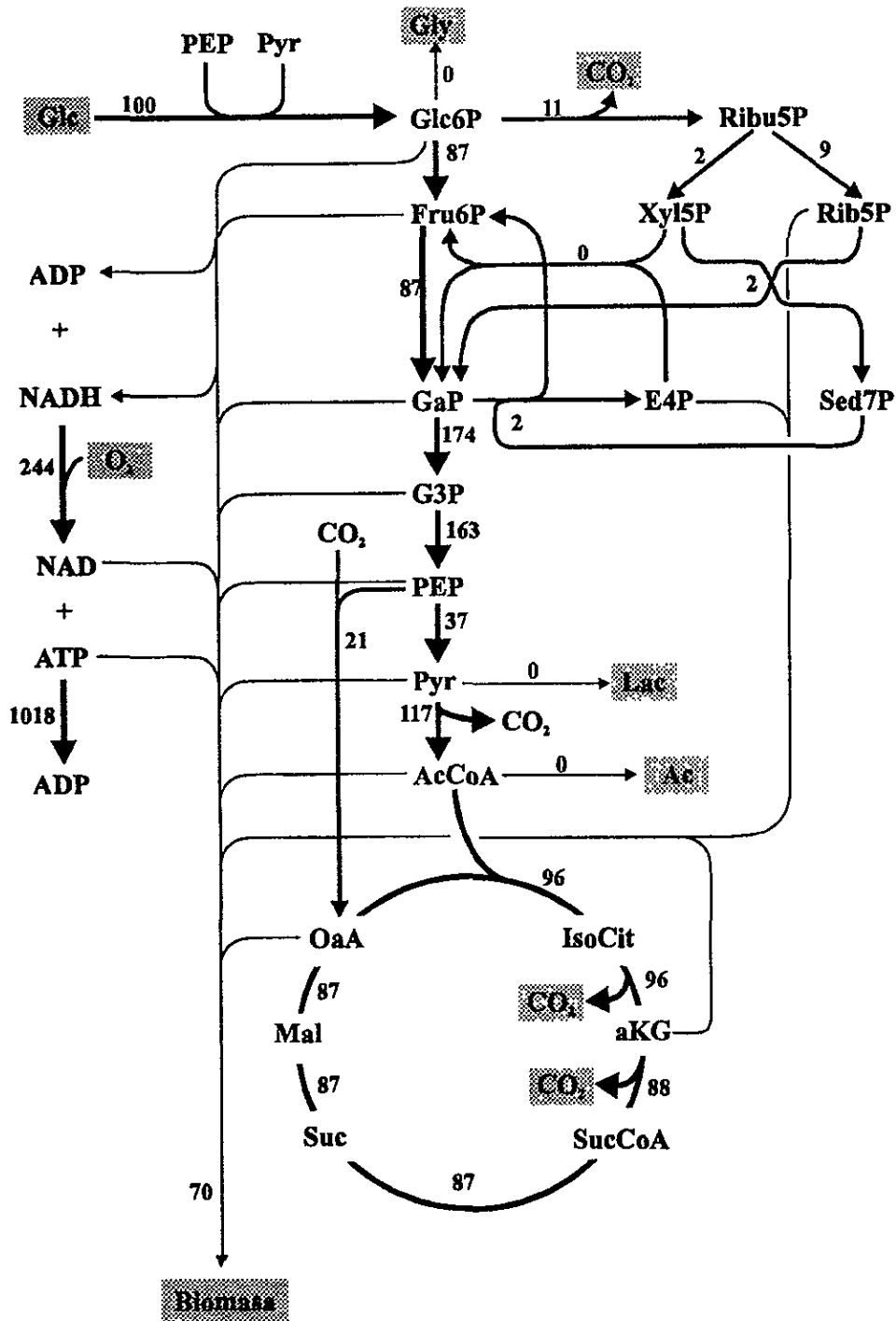


Figura 11. Distribución de flujos de carbono (%) correspondiente a la cepa JM101 ensayada a una velocidad de dilución de 0.3 h⁻¹.

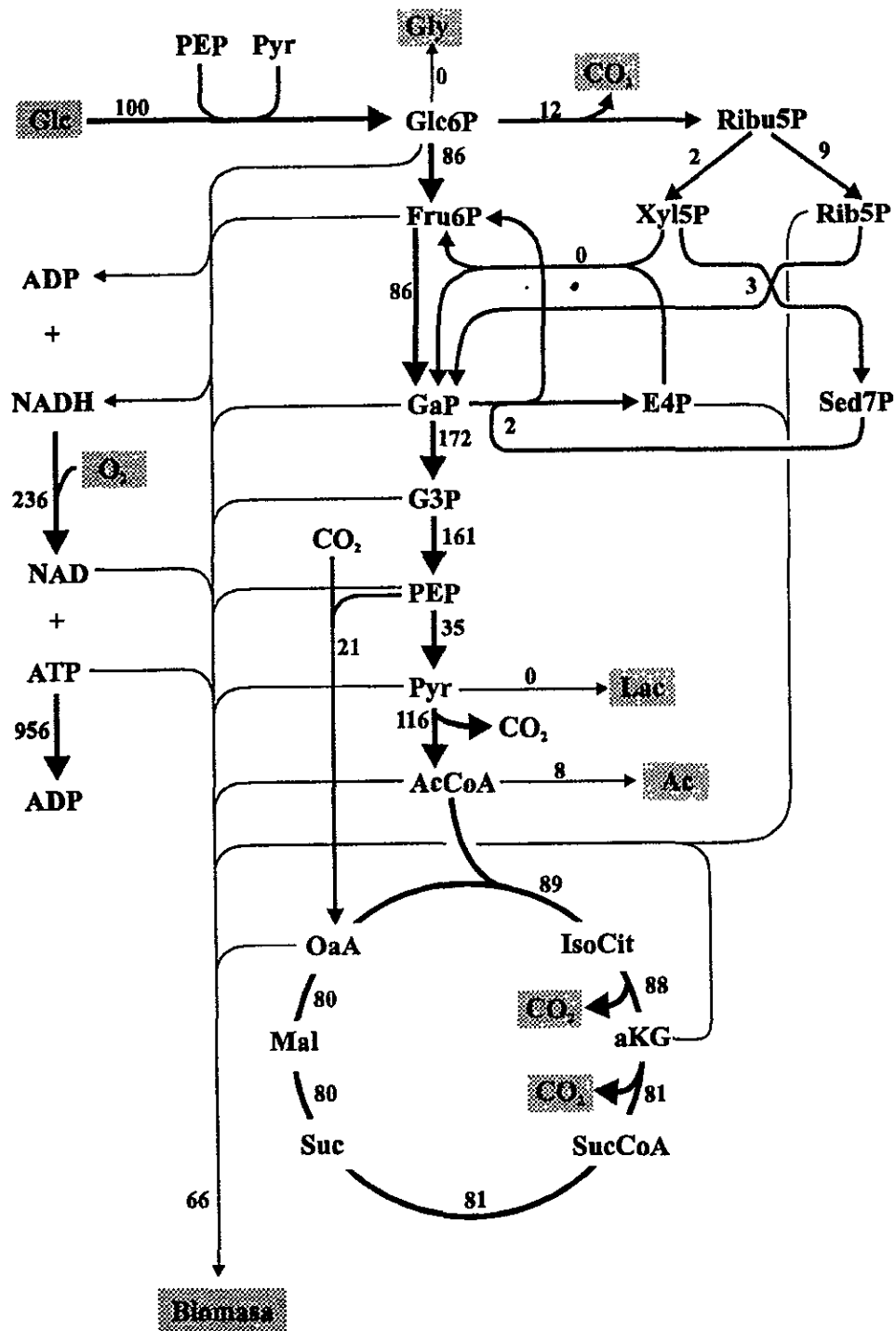


Figura 12. Distribución de flujos de carbono (%) correspondiente a la cepa JM101 ensayada a una velocidad de dilución de 0.35 h⁻¹.

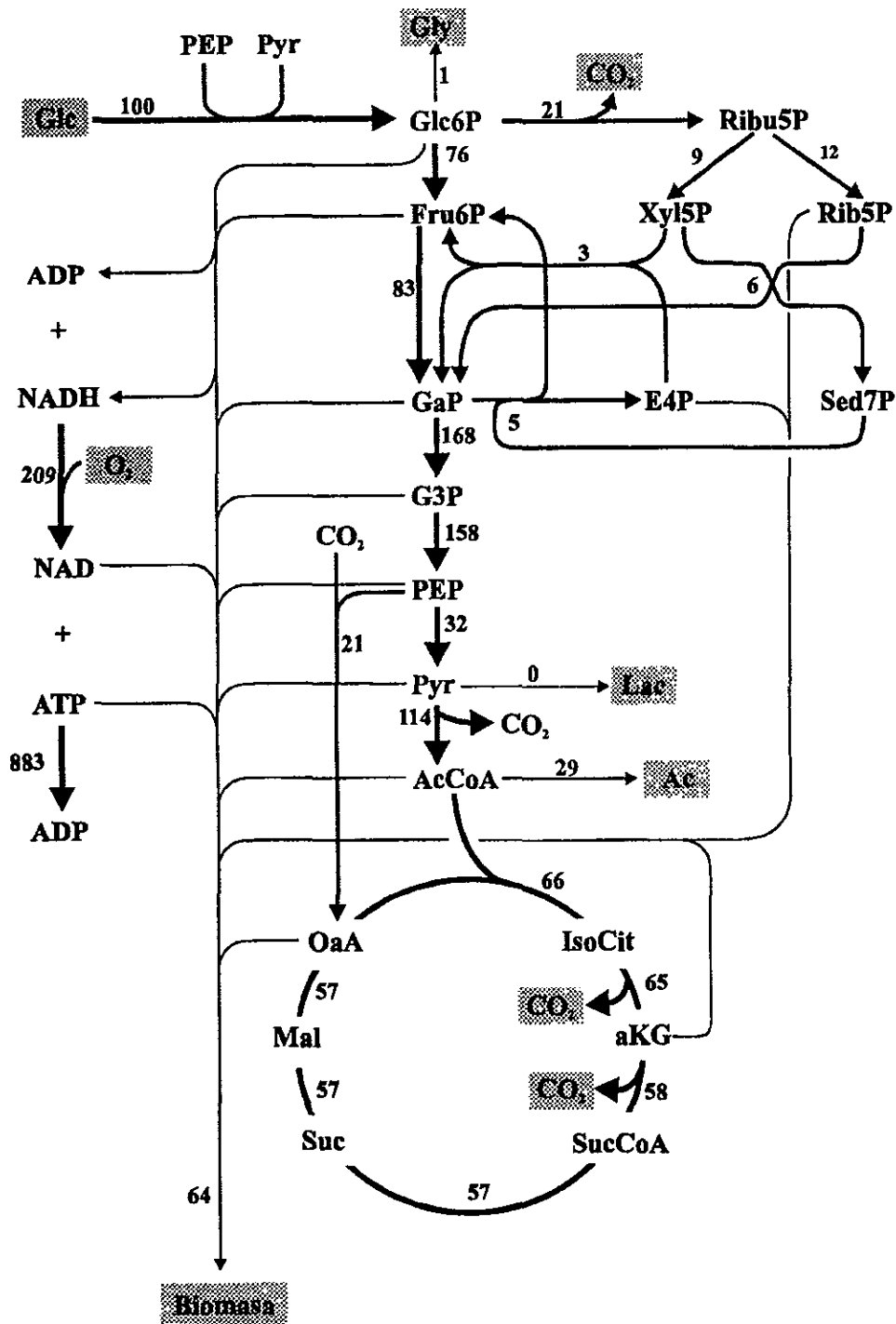


Figura 13. Distribución de flujo de carbono (%), correspondiente a la cepa JM101 ensayada a una velocidad de dilución de 0.5 h⁻¹.

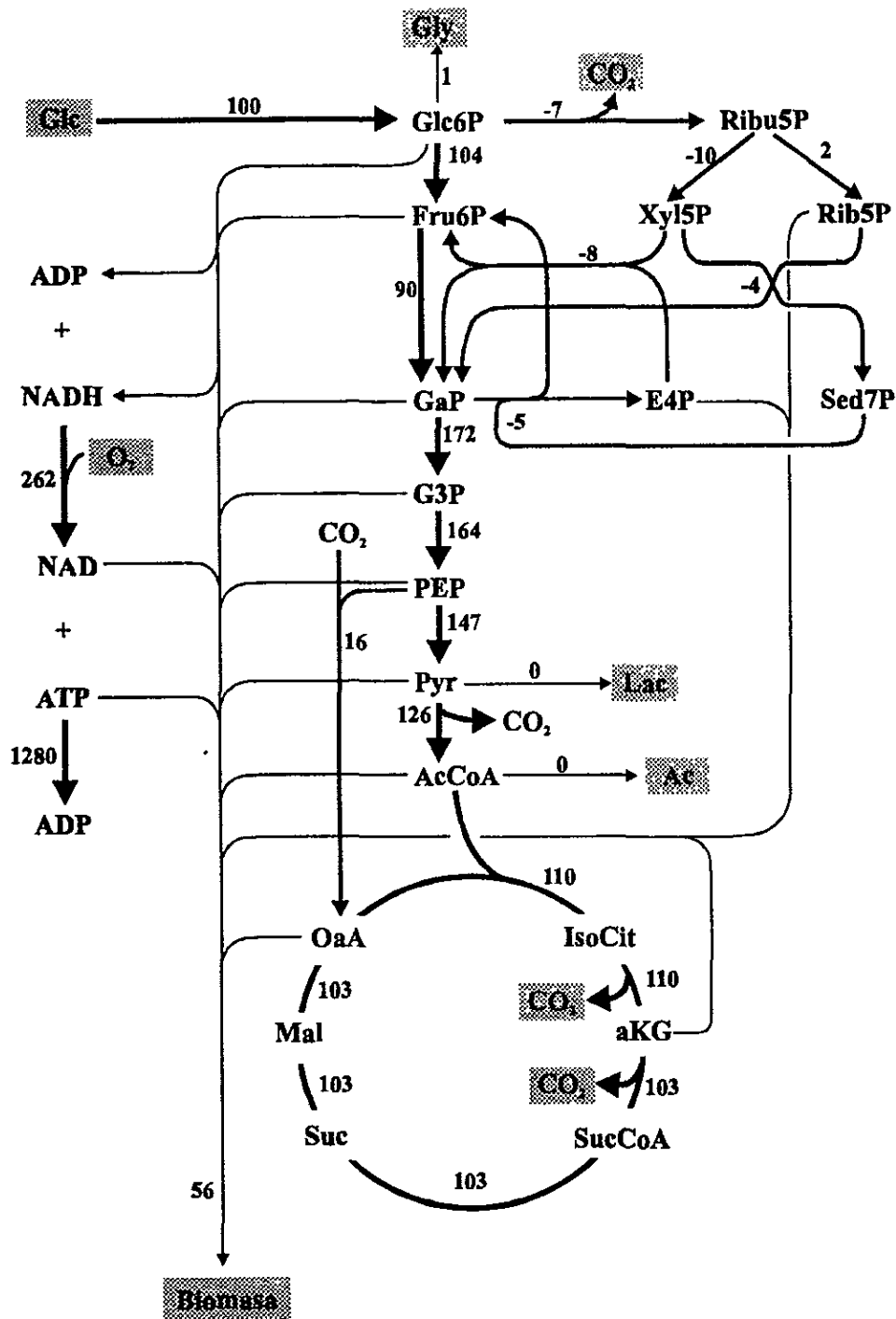


Figura 14. Distribución de los flujos de carbono intracelular de *E. coli* PB12 ensayada en cultivo continuo a una velocidad de dilución de 0.2 h^{-1} . Los flujos están normalizados al flujo de entrada de la glucosa, considerando a éste como el 100%.

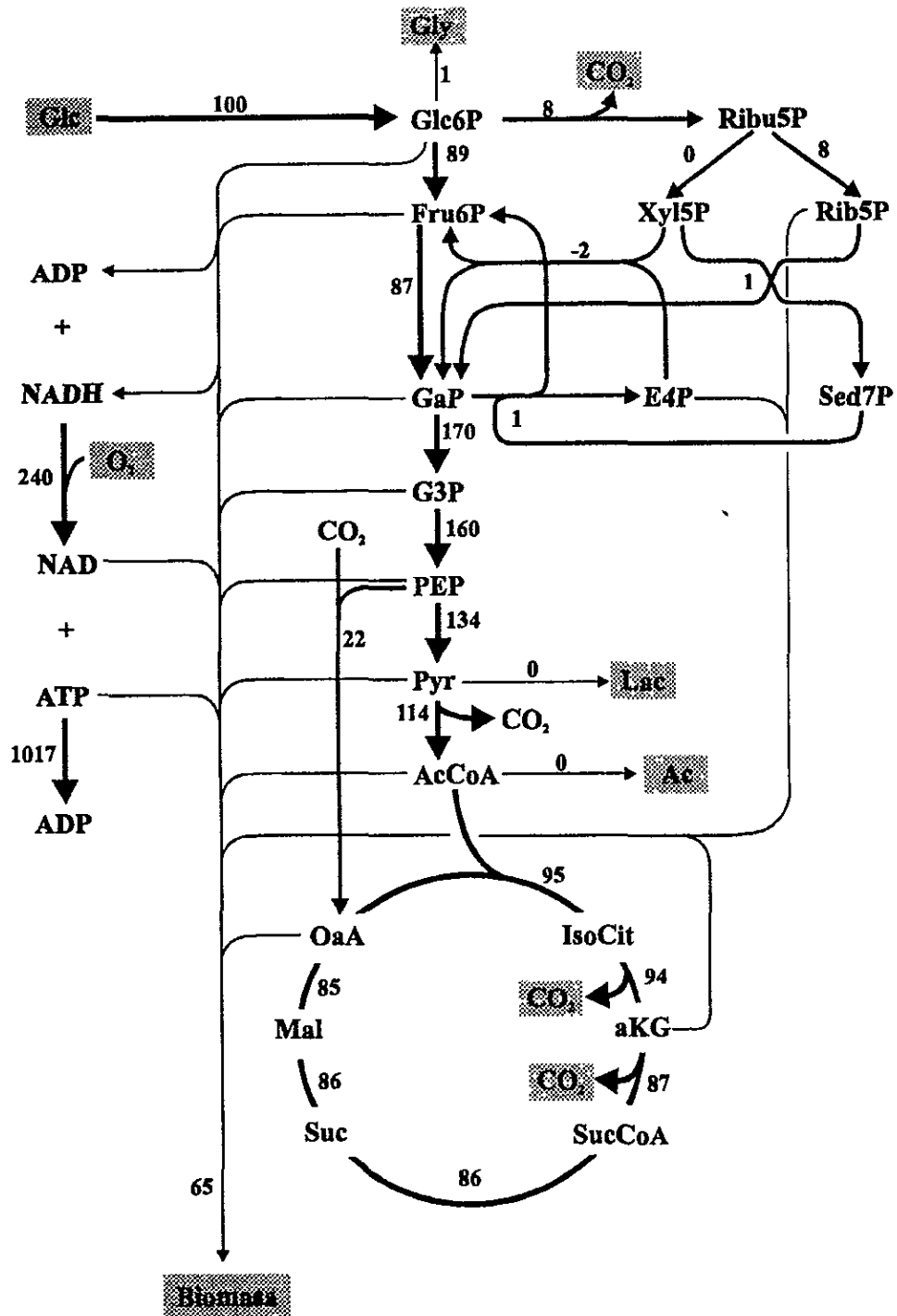


Figura 15. Distribución de flujo de carbono (%), correspondiente a la cepa PB12 ensayada a una velocidad de dilución de 0.3 h⁻¹.

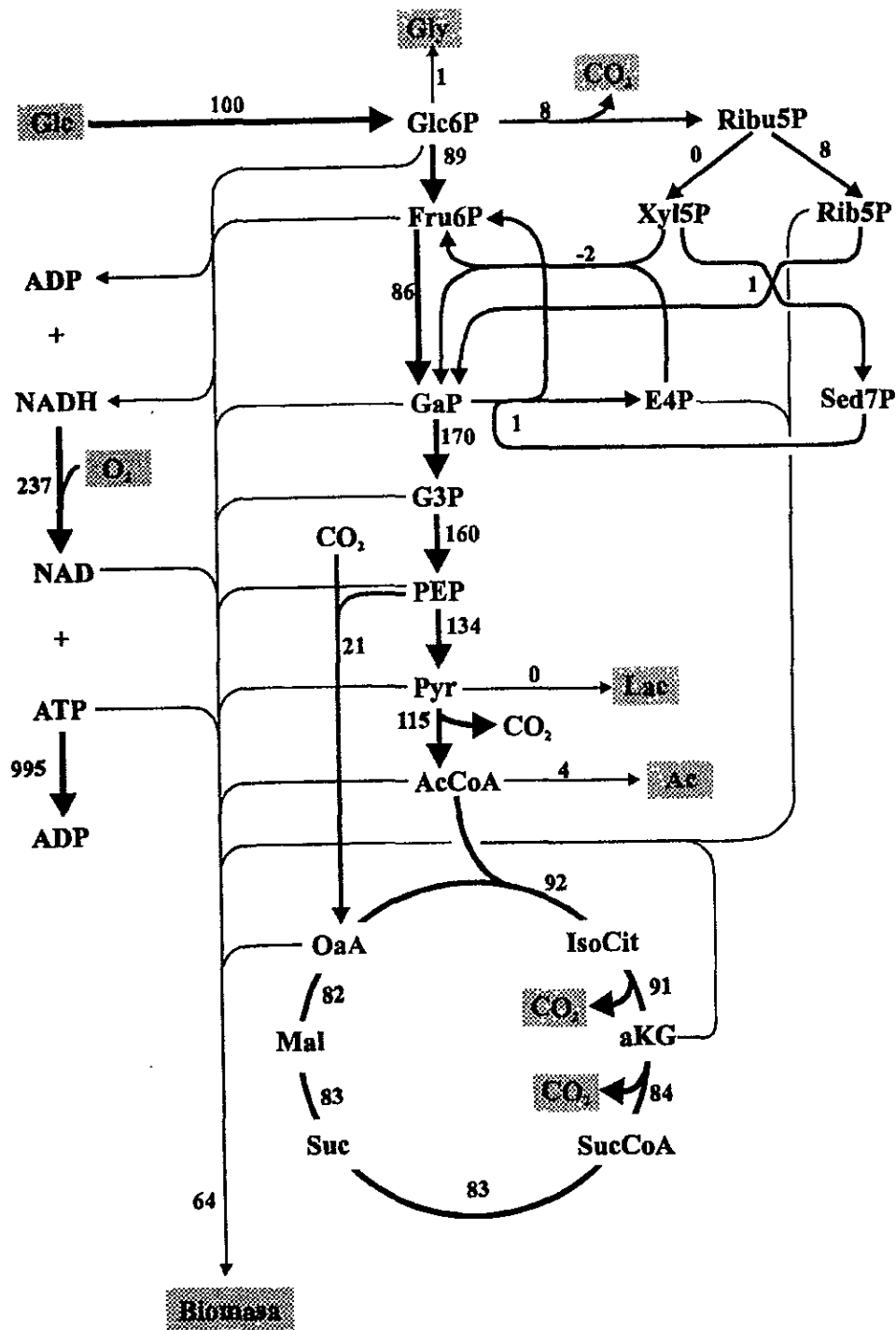


Figura 16. Distribución de flujos de carbono (%), correspondiente a la cepa PB12 ensayada a una velocidad de dilución de 0.35 h⁻¹.

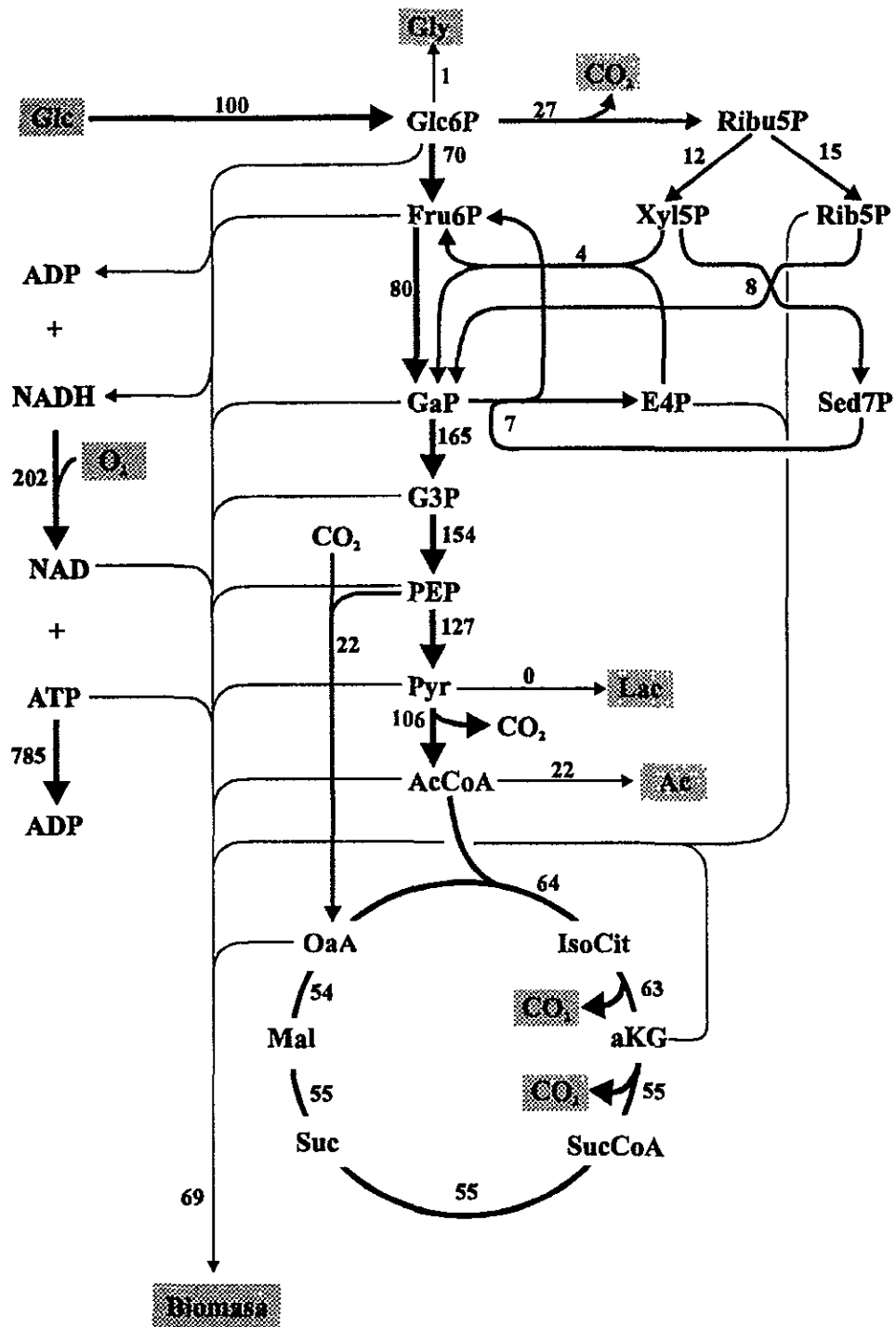


Figura 17. Distribución de flujos de carbono (%), correspondiente a la cepa PB12 ensayada a una velocidad de dilución de 0.5 h⁻¹.

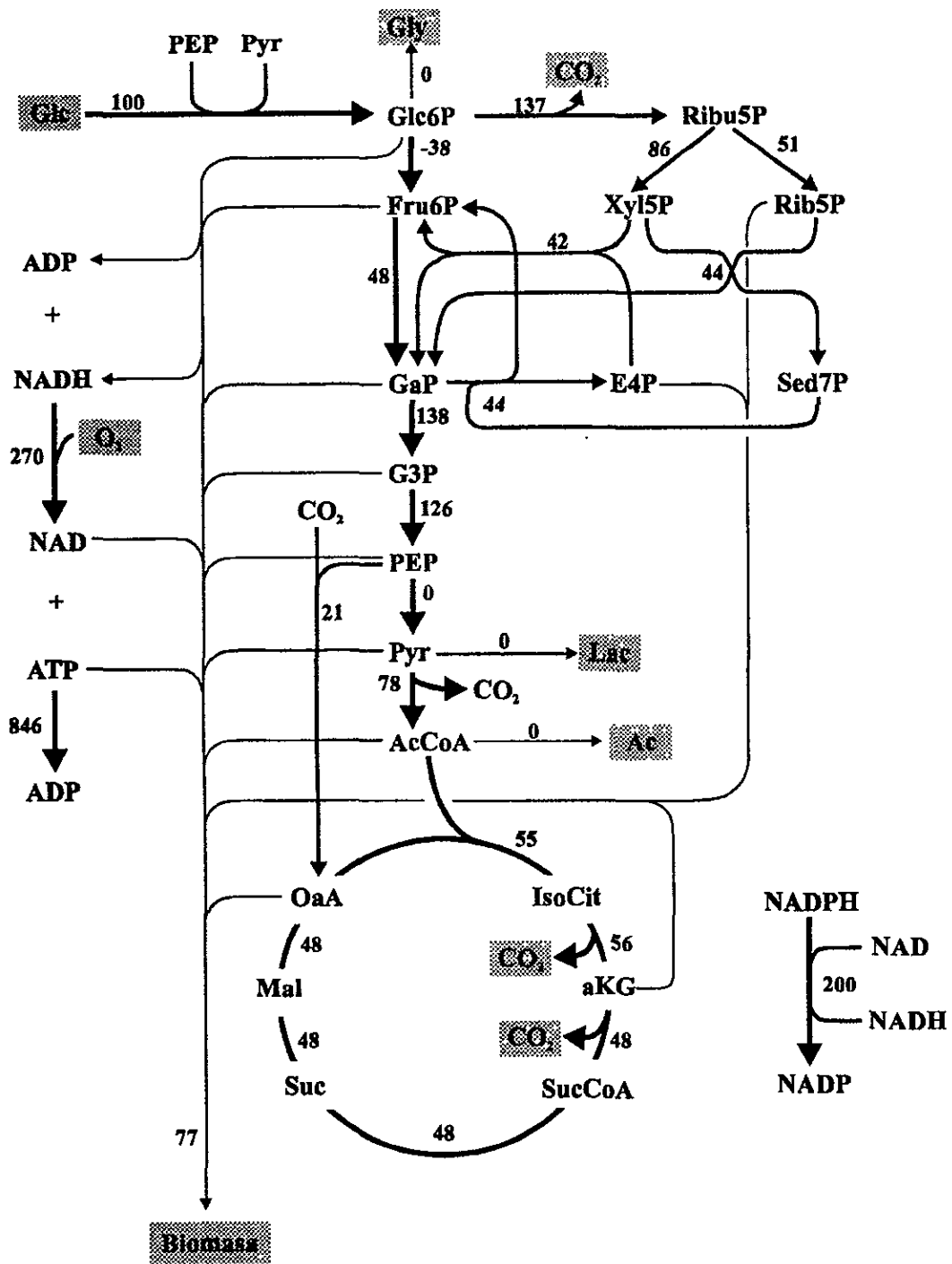


Figura 18. Distribución de los flujos de carbono intracelular de *E. coli* PB25 ensayada en cultivo continuo a una velocidad de dilución de 0.2 h⁻¹. Los flujos están normalizados al flujo de entrada de la glucosa, considerando a éste como el 100%.

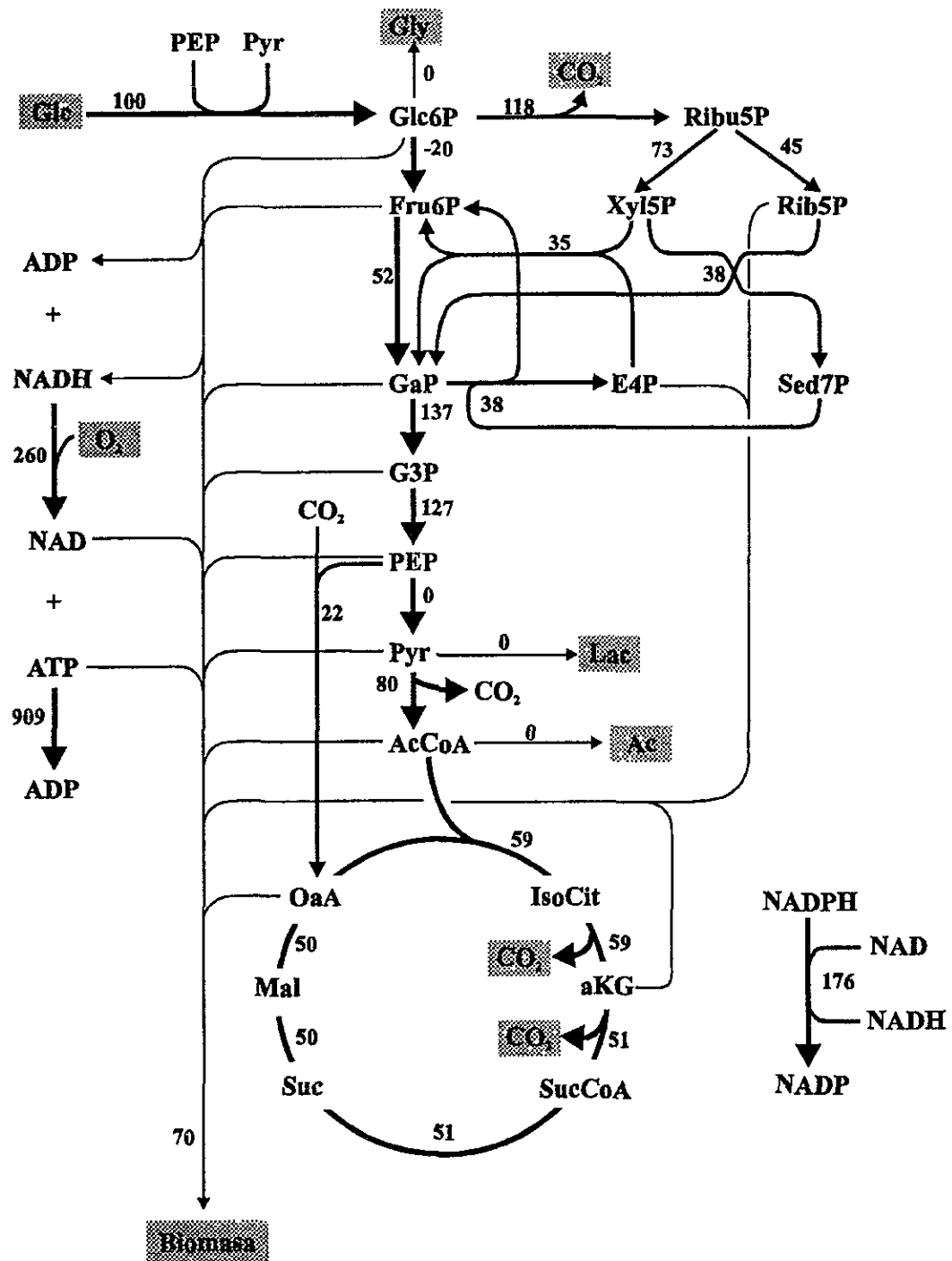


Figura 19. Distribución de flujos de carbono (%), correspondiente a la cepa PB25 ensayada a una velocidad de dilución de 0.3 h^{-1} .

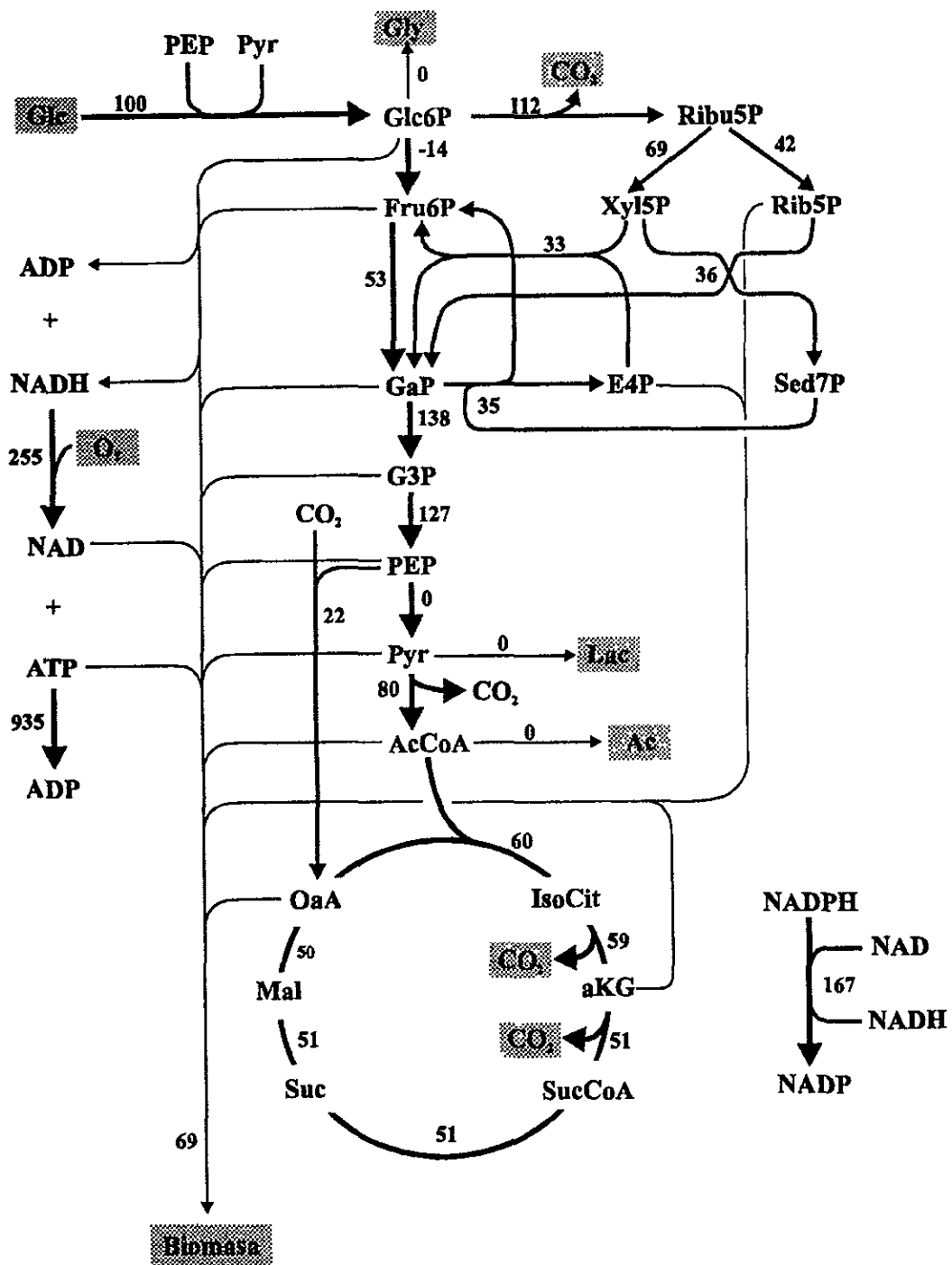


Figura 20. Distribución de flujos de carbono (%), correspondiente a la cepa PB25 ensayada a una velocidad de dilución de 0.35 h⁻¹.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

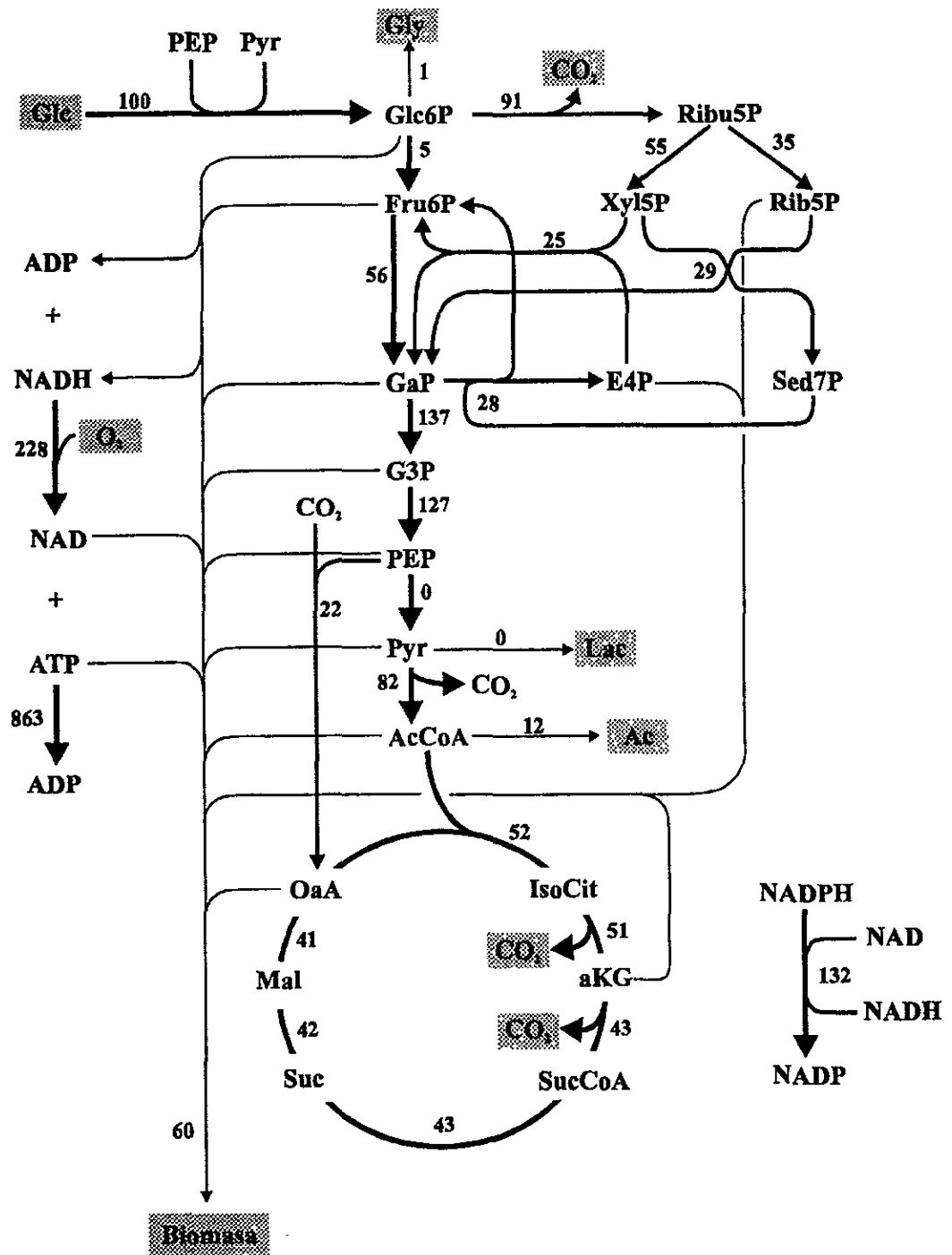


Figura 21. Distribución de flujos de carbono (%), correspondiente a la cepa PB25 ensayada a una velocidad de dilución de 0.5 h⁻¹.

La Figura 22 muestra los flujos relativos en la reacción catalizada por la glucosa fosfato isomerasa (r3 en la Figura 9). Esta reacción es representativa del flujo de carbono de entrada a la vía glicolítica. Es importante mencionar que las diferencias en los flujos de carbono, cuando se mencionan, poseen el carácter de ser estadísticamente significativas (no obstante ser ligeras en algunos casos), por un lado, debido a las bajas desviaciones obtenidas durante las mediciones, y por otro lado, a que los flujos son calculados por el BIONET a partir de un vector actualizado de mediciones experimentales, el cual incluye la componente del error experimental (S.D.). Como puede verse, los flujos en la cepa JM101 mostraron una tendencia descendente en función de la velocidad de dilución. Un patrón muy similar fue observado con la mutante PB12, sin embargo, en las tres primeras velocidades de dilución ensayadas, el flujo fue ligeramente mayor comparado con el observado por la cepa JM101. En contraste, el flujo de carbono observado a una velocidad de dilución de 0.5 h^{-1} fue menor al observado por la cepa JM101. Es interesante destacar que la mutación en PTS no provocó diferencias sustanciales en los flujos de carbono de la vía glicolítica. Contrastando con esto, los resultados obtenidos con la cepa PB25 fueron marcadamente diferentes. En este caso, los flujos calculados mostraron valores negativos en las tres primeras velocidades de dilución ensayadas, sin embargo, a una velocidad de dilución de 0.5 h^{-1} , se observó un flujo positivo. Esto sugiere una modificación muy drástica del reparto de los flujos en esta parte del metabolismo como consecuencia de la interrupción de la actividad de las piruvato cinasas (esto se discutirá mas ampliamente abajo).

La figura 23, muestra los flujos relativos de carbono en la reacción catalizada por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, representativa de la entrada de carbono en la vía de las pentosas. Como se puede apreciar, en las cepas JM101 y PB12 los flujos mostraron una tendencia a aumentar a medida que la velocidad de dilución se incrementó. En este sentido, se sabe que los niveles de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Zwf) y 6-fosfogluconato deshidrogenasa (Gnd) aumentan entre 3 y 5 veces conforme la velocidad de crecimiento aumenta de 0.1 a 0.5 h^{-1} (Wolf et al., 1979). En el caso de la cepa PB12 los flujos fueron menores en las tres primeras velocidades de dilución ensayadas, comparados con la cepa JM101, destacando particularmente la ausencia de flujo de carbono hacia la vía de las

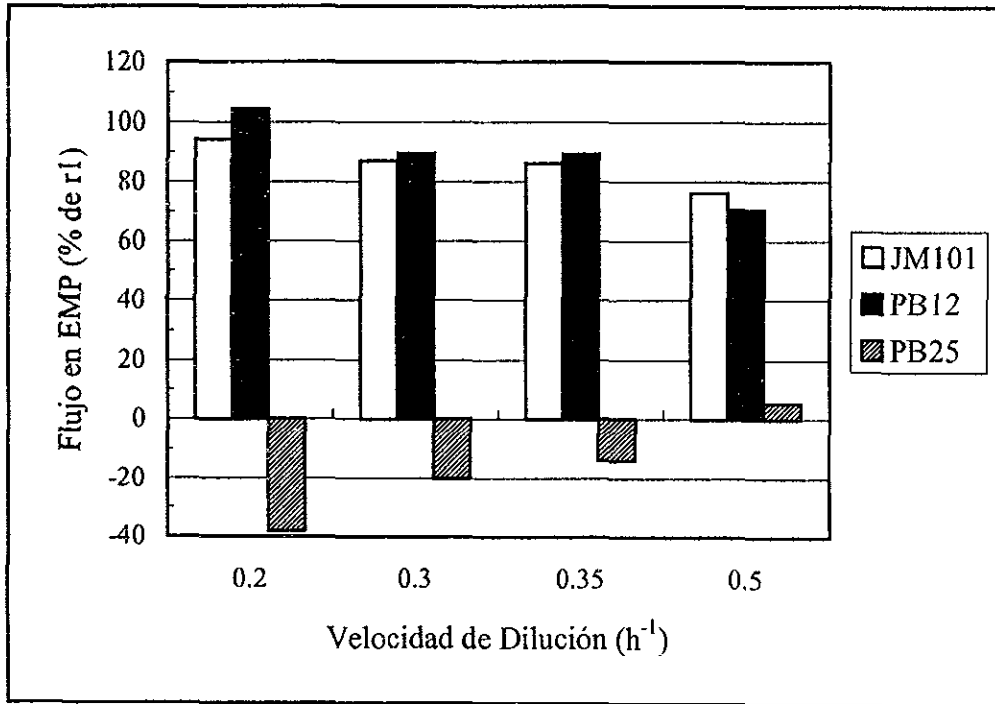


Figura. 22. Flujos de carbono en la reacción catalizada por la glucosa fosfato isomerasa (r3), correspondiente a la entrada de glucosa a la vía glicolítica glicolítica (EMP).

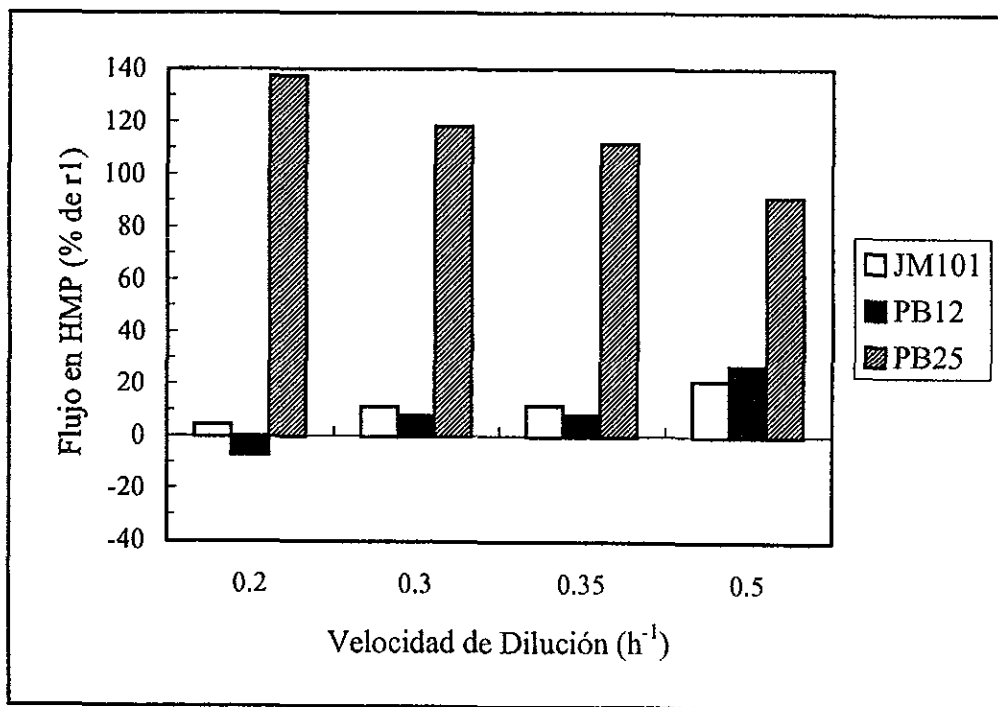


Figura 23. Flujos de carbono en la reacción catalizada por la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (r18) correspondiente a la entrada de carbono a la vía de las pentosas (HMP).

pentosas observado por la cepa PB12 a una velocidad de dilución de 0.2 h^{-1} . Cabe mencionar que en este caso el flujo se consideró cero debido a que un valor negativo para esta reacción es metabólicamente imposible, por ser irreversible. Es probable que el valor negativo sea mas bien producto de una inconsistencia, si bien ligera, lo cual no pudo ser eliminada de las rutinas de cálculo. Por otro lado, a una velocidad de dilución de 0.5 h^{-1} , este patrón se invirtió, siendo el flujo de la cepa PB12, ligeramente mayor al observado por la cepa JM101. Cabe hacer notar que los valores de reparto de flujo de carbono hacia la vía de las pentosas que se han observado a velocidades máximas de crecimiento en medio mínimo, van de 25 al 30% del flujo de entrada de la glucosa (Holms, 1986). Estos valores concuerdan bastante bien, con el observado por las cepas JM101 y PB12 a una velocidad de dilución de 0.5 h^{-1} . Es interesante destacar que el modelo metabólico propuesto para estas dos cepas, no permitió la inclusión de la actividad de la enzima transdehidrogenasa, lo cual sugiere un balance adecuado entre la generación y el empleo de NADPH para biosíntesis. En relación con los flujos mostrados por la cepa PB25 hacia la vía de las pentosas, se puso en evidencia una tendencia significativamente diferente. En las tres primeras velocidades de dilución, el flujo de carbono fue superior al 100%, lo cual es coherente con los flujos negativos observados por esta cepa en la reacción 3 (ver Figura 22). Cabe mencionar que los flujos que se obtienen en estos cálculos, son resultado de un balance, que en última instancia es función de la estequiometría del sistema. El aumento del flujo hacia la vía de las pentosas con valores de mas de 100% y los valores negativos observados con la cepa PB25, tienen una interpretación en términos de este balance. Un flujo mayor de 100% hacia la vía de las pentosas sería imposible a menos que se presentara la necesidad de justificar este flujo en el balance con una producción excesiva de NADPH y CO_2 , lo cual sería factible únicamente con un flujo negativo, precisamente en la reacción adyacente de este nodo, que en este caso es la reacción 3. Esto sugiere, desde el punto de vista del metabolismo, un efecto regulador del PEP (probablemente en exceso) sobre la fosfofructocinasa, lo cual traería como consecuencia una disminución sensible del flujo de carbono a lo largo de la vía glicolítica, con la consiguiente desviación de este hacia la vía de las pentosas, así como la probable formación de un ciclo de oxidación en esta vía. Contrariamente a lo observado por las cepas JM101 y PB12, en el caso de la cepa PB25, el modelo metabólico propuesto permitió la inclusión de la actividad de la

transdehidrogenasa. Lo anterior es coherente si se considera que al incrementarse el flujo de carbono hacia la vía de las pentosas, se presentaría un exceso de poder reductor, mismo que tendría que ser transformado en NADH. Esto quedó de manifiesto al observarse flujos positivos en los resultados correspondientes a esta reacción, los cuales disminuyeron con la velocidad de dilución, en correspondencia con la disminución del flujo de carbono en la vía de las pentosas (ver r26 en las Figuras 19-21).

La Figura 24, muestra el comportamiento de los flujos de carbono en la reacción catalizada por la citrato sintasa, la cual es representativa de la actividad del ciclo de los TCA (ver r11, r10 en la Figura 9). Con relación a las cepas JM101 y PB12, los flujos en esta reacción mostraron una marcada tendencia a descender a medida que la velocidad de dilución aumentó. Al comparar estas dos cepas, se verán ligeras diferencias en las fracciones de carbono de entrada al ciclo de los TCA, siendo similares aquellas mostradas a una velocidad de dilución de 0.3 h^{-1} , ligeramente mayores las mostradas por la cepa PB12 a velocidades de 0.2 y 0.35 h^{-1} , y ligeramente mayor la observada por la JM101 a una velocidad de dilución de 0.5 h^{-1} . Por otro lado, la cepa PB25 mostró flujos de carbono significativamente menores a los observados por las otras cepas en cada una de las velocidades de dilución ensayadas. Así mismo, a una velocidad de dilución de 0.5 h^{-1} todas las cepas observaron una disminución significativa de entrada de carbono al ciclo. Es interesante poner de relieve esta disminución de la actividad del ciclo de los TCA, lo cual en términos de energía para biosíntesis probablemente sería compensado por un aumento en el flujo de carbono en la vía de las pentosas, concordando a su vez aceptablemente con el comportamiento mostrado en la Figura 23 (ver también Figuras 10-17). Además se debe hacer notar que los flujos en la reacción 27, parte de la cual es debida a energía de mantenimiento, disminuye a medida que la velocidad de dilución aumenta, al menos en el caso de las cepas JM101 y PB12, lo cual también es coherente con la disminución en la actividad del ciclo de los TCA (ver Figuras 10-17).

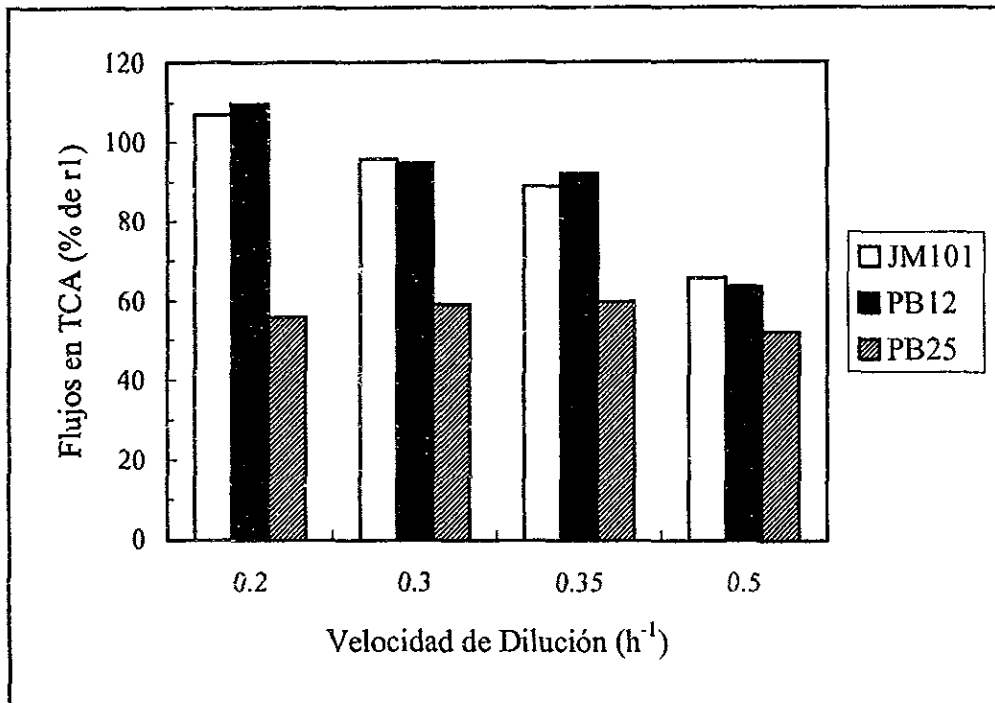


Figura 24. Flujos de carbono en la reacción catalizada por la citrato cintasa (r11) representativa de la entrada de carbono al ciclo de los TCA.

7.0 DISCUSSION

La acumulación de ácido acético en cepas de *Escherichia coli*, ha sido caracterizada como un fenómeno de desborde metabólico motivado por una limitada capacidad oxidativa del ciclo de los TCA (Han et al., 1992; Majewski & Domach, 1990). El desborde se observa cuando el microorganismo presenta una alta demanda de ATP para satisfacer las necesidades de un crecimiento a altas velocidades (El Mansi & Holms, 1989). Dado que la vía de producción de ácido acético, es la segunda mayor fuente generadora de ATP a nivel de sustrato, entonces el flujo de carbono se reorienta hacia este punto. No obstante que existen numerosos reportes sobre este fenómeno, aún se encuentra lejos una comprensión cabal del mismo. Para tratar de entender los mecanismos fisiológicos que subyacen alrededor de esta manifestación, se han estudiado diferentes mutaciones en cepas de *Escherichia coli* (Aristidou et al., 1994; Chou, et al., 1994; Dedhia, et al., 1994; Díaz-Ricci, et al., 1991; Farmer & Liao, 1997). El objetivo implícito en estos trabajos es reducir la acumulación del ácido acético mediante la reorientación de los flujos de carbono en el metabolismo central, sin afectar significativamente otros parámetros cinéticos, tales como la velocidad específica de crecimiento o los valores de rendimiento celular o de producto.

La construcción de las cepas PB12 y PB25, se llevó a cabo pensando fundamentalmente en el mejoramiento de los rendimientos de aminoácidos aromáticos. Sin embargo, la naturaleza de las mutaciones permitió reflexionar sobre las posibilidades de estas mutaciones como un modelo de trabajo para tratar de comprender mejor el fenómeno de acumulación de ácido acético. En este sentido, se ha especulado y definido teóricamente, que los genes asociados a las actividades de PTS y de las piruvato cinasas son algunos de los más importantes objetivos para modificar sensiblemente los patrones de acumulación de ácido acético (Delgado & Liao, 1997; Goel et al., 1995). El mecanismo fisiológico que subyace tras este razonamiento, válido para las dos mutantes, tiene que ver con el efecto del PEP como regulador del flujo de carbono, al afectar negativamente la actividad de la fosfofructocinasa. (Fraenkel, 1996). Se pensó que cuando estas cepas fueran propagadas sin la presencia de plásmidos adecuados para sobreexpresar las enzimas involucradas en la sobreproducción de aminoácidos aromáticos, se presentaría un fenómeno de regulación por la presencia de un exceso de PEP, el cual sería resultado en el caso de la cepa PB12 de la inactivación de PTS,

y en la cepa PB25 del bloqueo del flujo de carbono a nivel de las piruvato cinasas. Se pensó también que este efecto regulador, traería como consecuencia una disminución en la disponibilidad de piruvato para desbordar el metabolismo.

Los razonamientos anteriores formaron la base de una reflexión aún más importante, como lo fue el planteamiento de la necesidad de realizar un estudio integral y más razonado, y que fuera mas allá de unos simples ensayos en fermentador, ya sea en cultivo por lote o continuo con la finalidad de conocer con un enfoque novedoso este fenómeno de desborde metabólico. Los experimentos cinéticos típicos permiten conocer (limitadamente, ahora se sabe), el efecto de algún fondo genético particular sobre los parámetros que definen el comportamiento de un microorganismo, sin embargo, existen enfoques novedosos que han permitido un trabajo más sistemático y razonado en la planeación, construcción y evaluación de cepas modificadas genéticamente. El adaptar este conocimiento novedoso a los quehaceres de nuestro grupo de investigación tendría consecuencias bastante fructíferas, habida cuenta que las actividades del mismo están orientadas al mejoramiento genético de cepas de producción industrial.

Por otro lado, se ha comprobado ampliamente que la ingeniería genética por sí sola, tampoco basta. Hasta hace algún tiempo, el trabajo de mejoramiento genético de nuestro grupo se venía limitando a quehaceres mas o menos complejos de modificación genética con el subsiguiente ensayo a nivel de fermentador para conocer el efecto de dicha modificación sobre el comportamiento cinético, sin conocer a ciencia cierta sus efectos sobre el metabolismo. Por lo tanto, es cada vez más evidente la necesidad de promover un enfoque integral en este campo de la investigación, que incluya principalmente herramientas derivadas de la ingeniería química. En este sentido, la ingeniería de vías metabólicas mostró ser un complemento idóneo para el trabajo de caracterización cinética planteado para las mutantes PB12 y PB25, afectadas en el metabolismo del fosfoenolpiruvato, en relación con su capacidad para acumular ácido acético. La evaluación de los flujos de carbono intracelulares en estas cepas, permitió conocer instantáneas del metabolismo en estado fisiológico particular. El integrar las herramientas propias de la ingeniería genética, así como

el haber dado un paso adelante en los quehaceres cotidianos de caracterización, mediante la implementación del concepto de ingeniería de vías metabólicas en la caracterización las mutantes PB12 y PB25, permitió realizar una contribución sustancial al conocimiento, la cual fue mas allá de la típica contribución que sobre este tipo de microorganismos se ha venido obteniendo hasta ahora, particularmente en nuestro grupo de trabajo.

Es importante recalcar que uno de los intereses esenciales de nuestro grupo, lo cual motivó en parte la realización de este trabajo, se centra en tratar de comprender los mecanismos que subyacen tras el fenómeno de acumulación de ácido acético en cepas de *Escherichia coli*. La comprensión cabal de estos mecanismos tendría una repercusión importante en el desempeño de los sistemas recombinantes que actualmente se emplean en nuestro laboratorio en varios programas de mejoramiento genético. En las líneas subsiguientes se discuten de manera integral, tanto desde el punto de vista cinético como metabólico, los efectos sobre la capacidad de acumulación de ácido acético de las mutantes, observados tanto en cultivo por lote como en continuo.

7.1 Experimentos en cultivo por lote.

En estos experimentos se mostraron diferencias significativas en los patrones de acumulación de ácido acético cuando las tres cepas fueron cultivadas en medio mínimo o complejo. Como se mencionó anteriormente, las diferencias mostradas en medio mínimo pudieron ser causadas también por las diferencias observadas en la μ (ver Tabla 1). Es interesante puntualizar que en este caso, el efecto observado sobre la μ , está directamente relacionado con la naturaleza de las mutaciones de las cepas PB12 y PB25, ya que una consecuencia de alterar tan drásticamente el flujo de carbono mediante mutaciones en PTS, y en las piruvato cinasas, es una reducción en la capacidad de asimilación de glucosa, y consecuentemente un impacto negativo sobre la μ . Por otro lado, en medio complejo, además de las diferencias observadas en las capacidades de acumulación de ácido acético, comparadas con la cepa silvestre, también se observaron diferencias significativas en las velocidades específicas de crecimiento. Este resultado fue inesperado, ya que en un medio

complejo, el carbono de la glucosa no es empleado en los procesos anabólicos, sino únicamente como fuente de energía. En el primer caso, los precursores para la síntesis de macromoléculas se obtienen a partir del extracto de levadura. Si bien es cierto que las mutaciones provocaron una reducción de la velocidad de asimilación de glucosa (ver Tabla 2), también se esperarían velocidades específicas de crecimiento similares a la observada por la cepa progenitora, debido a la reducción de la participación de la glucosa en la formación de precursores. En la mutante PTS este fenómeno puede ser explicado si se considera que es una mutante espontánea, cuyo fenotipo es producto de una o múltiples mutaciones (desconocidas hasta ahora), una de las cuales por cierto, tuvo como consecuencia la adquisición de la capacidad de asimilar a la glucosa por una vía alterna (Flores et al., 1997). También se debe mencionar que algunos resultados reportados en el trabajo citado, mostraron que esta cepa modificó sensiblemente su patrón de asimilación de aminoácidos. Esto sugiere que la cepa PB12 podría tener alterado el sistema de transporte de algunos aminoácidos, lo cual pudo haber influido en la disminución de la velocidad específica de crecimiento. Por otro lado, la cepa PB25 no posee mutaciones desconocidas, por ende, una explicación resulta difícil, sin embargo, es interesante recalcar que la actividad de las piruvato cinasas está asociada a PTS. En este sentido, algunos resultados publicados al respecto, han permitido especular que existe un vínculo entre los mecanismos de asimilación de carbono, verificados en PTS, y la asimilación del nitrógeno, de aquí que no se pueda descartar algún efecto pleiotrópico que afectara los procesos de transporte de aminoácidos, disminuyendo con esto la velocidad específica de crecimiento (Postma et al., 1993).

Es de relevancia puntualizar que las similitudes en la velocidad específica de crecimiento mostradas por las cepas PB12 y PB25 en un medio complejo, permiten hacer la comparación de algunas características de crecimiento. En la cepa PB12 se observó una reducción sustancial en la velocidad específica de consumo de glucosa comparada con la observada por la PB25. Esto trajo como consecuencia una disminución sustancial en la producción específica de ácido acético, junto con una mayor eficiencia en la formación de biomasa, lo cual se reflejó en los datos de rendimiento celular (ver Tabla 2). Lo anterior sugiere que las mutaciones provocaron diferencias notables en el comportamiento de los

flujos de carbono intracelular en estas dos cepas. Mientras en la cepa PB12, el carbono fue empleado de manera más eficiente, en la cepa PB25, parte del flujo de carbono se orientó hacia la formación de ácido acético y muy probablemente hacia una vía oxidativa alterna, (aparentemente la vía de las pentosas). Esto se tradujo en valores de rendimiento similares a los observados por la cepa JM101, a pesar de que la cepa PB25, acumuló menos ácido acético. En apoyo al argumento anterior, se debe mencionar que en los estudios respirométricos realizados por Ponce et al. (1998) con la cepa PB25, se observó un aumento sustancial en la producción de CO₂ en la vía de las pentosas comparado con el mostrado por la cepa JM101.

Por otro lado, es importante mencionar que la interpretación de los datos de producción y consumo de ácido acético resulta un tanto compleja, debido a las diversas posibilidades que existen. Por ejemplo, podría darse el caso de que, bajo las condiciones de crecimiento empleadas, el consumo y la producción de ácido acético fueran constantes y de igual magnitud. En esta situación, la acumulación de ácido acético solo se obtendría cuando hubiera un desbalance en las velocidades de producción y utilización. Sin embargo, los datos obtenidos para la cepa JM101 en medio complejo son consistentes con lo reportado en la literatura (ver Figura 6), pues es generalmente aceptado que en presencia de la glucosa, existe un efecto de represión catabólica sobre los genes involucrados en la reasimilación del ácido acético, sin embargo, una vez que la glucosa ha sido consumida, la presencia de ácido acético serviría para satisfacer las necesidades catabólicas del microorganismo en un medio complejo (Cronan & LaPorte, 1996). Por otro lado, la interpretación del consumo de ácido acético en presencia de glucosa por la JM101 y la PB25 en medio mínimo, así como el observado por la cepa PB12 en medio complejo, en presencia de relativamente altas concentraciones de glucosa, resulta un tanto compleja. Sin embargo, en cepas de *Escherichia coli* se ha observado que las concentraciones de glucosa por debajo de 0.5 g/L, permiten la expresión de las enzimas de la vía del glioxilato, encargadas de la reasimilación del ácido acético. También se ha observado que la expresión de esta vía, en presencia de glucosa, al parecer depende del pH, la concentración de la glucosa e incluso de la concentración del ácido acético (Kleman & Strohl, 1994). Por otro lado, es probable que en ambas cepas, los sistemas de represión catabólica se encuentren

alterados. Se sabe que la principal enzima controladora de la asimilación del ácido acético es la isocitrato deshidrogenasa, la cual al inactivarse por fosforilación, permite el flujo de carbono hacia la ruta del glioxilato. La actividad de esta enzima tiene como efector positivo al piruvato y como negativos al citrato y el 3-fosfoglicetato, los cuales actúan como indicadores generales de la concentración de precursores en el metabolismo central (Cronan & LaPorte, 1996). Es probable, que en la cepa PB12, cuando fue cultivada en un medio complejo, por efecto de la regulación de PEP sobre la fosfofructocinasa, con el consiguiente efecto atenuador del flujo de carbono en la vía glicolítica, además de la ausencia del piruvato proveniente de la actividad de PTS, se manifieste un déficit de piruvato, provocando con esto un aumento en la concentración de isocitrato deshidrogenasa fosforilada y la consiguiente desviación del flujo de carbono hacia la vía del glioxilato.

7.2 Experimentos en cultivo continuo

De acuerdo con los resultados observados en cultivo continuo, la mutación en PTS tuvo como efecto una disminución significativa sobre la acumulación de ácido acético comparada con la observada por la cepa progenitora (ver Figura 7). Contrariamente a lo esperado, el efecto de esta mutación sobre la distribución de los flujos de carbono en el metabolismo central, obtenidas con el programa BIONET, sólo fue notorio (si bien ligeramente) en algunas velocidades de dilución comparadas con las observadas por la cepa JM101 (ver Figuras 22-24). Lo anterior sugiere que para esta mutante, el efecto regulador del PEP sobre el flujo de carbono en la vía glicolítica no fue determinante, al menos a bajas velocidades de dilución. Es interesante puntualizar además, que las diferencias en la acumulación de ácido acético, aparentemente no estuvieron asociadas a una misma causa en los patrones de distribución de flujos de carbono. Sin embargo, como se verá más adelante, los resultados sugieren que la actividad de las piruvato cinasas tuvieron un papel relevante en la definición de los patrones de flujo en el metabolismo central.

Como puede verse, la cepa PB12 mostró una mayor actividad oxidativa a una velocidad de dilución de 0.2 h^{-1} , lo cual se reflejó en un ligero aumento de la producción específica de CO_2 , comparada con la JM101, así como un aumento notable en el consumo específico de

oxígeno (ver Figura 8bc). Esto fue consistente con el aumento en la actividad oxidativa del ciclo de los TCA, lo cual se puso de manifiesto por un ligero aumento del flujo de carbono hacia esta vía, comparado con el observado por la cepa JM101 (ver Figura 24). En apariencia el aumento de flujo de carbono hacia el ciclo de TCA no es suficiente para justificar un aumento significativo en el consumo de oxígeno, sin embargo, no se debe perder de vista que en este ciclo se produce la mayor parte del poder reductor del metabolismo central, y que un aumento sutil del flujo de carbono hacia este punto, tendría un impacto significativo en el consumo de oxígeno. Por otro lado, este aumento se esperaría si se considera la ausencia de flujo de carbono hacia la parte oxidativa de la vía de las pentosas (ver Figura 23), así como las necesidades de poder reductor en forma de NADPH. En condiciones normales, las necesidades de poder reductor para biosíntesis son satisfechas en parte por la actividad desplegada en el segmento oxidativo de la vía de las pentosas, por lo tanto, la ausencia de actividad en esta parte de la vía, tendría que ser compensado con un aumento en la actividad del ciclo de los TCA.

A una velocidad de dilución de 0.3 h^{-1} , no se observaron diferencias notables en los diferentes parámetros de fermentación obtenidos entre las cepas PB12 y JM101 (ver Figuras 7 y 8), lo cual no se reflejó completamente en la distribución de flujos de carbono, ya que se observaron diferencias, si bien marginales, en los flujos de carbono hacia las vías glicolítica y de las pentosas, así como del ciclo de los TCA (ver Figuras 22, 23 y 24).

Por otro lado, algunos autores han planteado que la disminución en la acumulación de ácido acético podría conseguirse mediante un aumento en la actividad oxidativa del ciclo de los TCA (Han et al., 1991). Este pudo haber sido el caso en el comportamiento mostrado por la cepa PB12, a una velocidad de dilución de 0.35 h^{-1} . No obstante, el efecto no fue lo suficientemente claro. Junto con una diferencia significativa en la acumulación de ácido acético, comparada con la cepa JM101, se observó un aumento del flujo de carbono hacia el ciclo de los TCA. No obstante ser marginal este aumento, hubo una cierta concordancia, con la disminución del flujo de carbono hacia la vía de las pentosas (ver Figuras 23 y 24). Sin embargo este aumento marginal en la actividad oxidativa del ciclo no se reflejó notablemente en los niveles de consumo de oxígeno (ver Figura 8).

El paso catalizado por la glucosa fosfato isomerasa ha sido reportado como el punto de más alta sensibilidad de aquellos que han sido descritos como importantes objetivos para disminuir la producción de ácido acético (Delgado & Liao, 1997). De acuerdo con esto, una sutil disminución del flujo a través de la reacción catalizada por esta reacción, tendría una repercusión considerable sobre la disminución de la acumulación de ácido acético. Una manera relativamente sencilla para producir este efecto, sería mediante la modificación del reparto de flujos de carbono hacia la vía glicolítica y de las pentosas. En este planteamiento, el PEP sería un elemento importante, ya que actuaría como un efector negativo de la actividad de la fosfofructocinasa. En consecuencia, se esperaría una modificación del reparto de flujos con una disminución hacia la reacción catalizada por la glucosa fosfato isomerasa, y un aumento concomitante del flujo hacia la vía de las pentosas. Este escenario pudo haber sido el caso con la cepa PB12, cuando se ensayó una velocidad de dilución de 0.5 h^{-1} , velocidad en la cual se observó un aumento del flujo de carbono hacia la vía de las pentosas, con la consiguiente disminución en el flujo de carbono en la vía glicolítica, así como una disminución concomitante en la acumulación de ácido acético (ver Figura 22 y 23; y Figura 7a). Por otro lado, a esta velocidad de dilución y comparado con lo observado por la JM101, se observó una menor actividad oxidativa, con valores bajos de producción específica de CO_2 , así como de consumo específico de oxígeno (ver Figura 8bc), lo cual también se reflejó en mayores niveles de rendimiento celular (ver Figura 7a). La disminución en la actividad oxidativa fue consecuencia directa en primer lugar de una disminución en el consumo específico de glucosa (ver Figura 8a). Esta diferencia en la actividad oxidativa se reflejó también, si bien marginalmente, en una disminución actividad del ciclo de los TCA (ver Figura 24). Es interesante hacer notar que la disminución en la producción de CO_2 con la cepa PB12 fue consecuencia también de una disminución en el flujo de carbono en la reacción correspondiente a la piruvato deshidrogenasa (ver Figuras 13 y 17). Este comportamiento es consistente si se considera que al aminorarse la producción de ácido acético, cuyo precursor en la vía glicolítica es la acetilCo A, también se disminuiría la oxidación de piruvato, el cual, ahora, podría ser utilizado en la formación de material celular. Como se mencionó, la disminución observada en la velocidad específica de consumo de oxígeno en la cepa PB12, también pudo ser consecuencia de una disminución en la velocidad específica de consumo de glucosa, lo cual

se reflejó, si bien ligeramente, en menores flujos de entrada de carbono tanto en la vía glicolítica como en el ciclo de los TCA (ver Figura 13 y 17).

Los experimentos realizados con la mutante PB25, permitieron observar una reducción sustancial en los niveles de acumulación de ácido acético, comparados con los observados por la cepa JM101, lo cual pudo ser consecuencia de la notable modificación de la distribución de flujos de carbono en el metabolismo central. El cálculo de los flujos intracelulares reveló que un aumento del flujo de carbono hacia la vía de las pentosas con una concomitante reducción del flujo en la vía glicolítica, favoreció la disminución en la acumulación de ácido acético. En este caso, al igual que en la situación discutida líneas arriba, se habría presentado un efecto regulador del PEP sobre la glucosa fosfato isomerasa. Es interesante destacar los flujos negativos en la reacción catalizada por la glucosa fosfato isomerasa, los cuales fueron observados en las tres primeras velocidades de dilución ensayadas. Esto sugiere la formación de un ciclo de oxidación en la vía de las pentosas con lo cual se vería estimulado el catabolismo de la glucosa en esta parte del metabolismo (ver Figuras 18-20 y 23). En la primera velocidad de dilución ensayada, alrededor del 30% del carbono fluye hacia la parte oxidativa de la vía de las pentosas y es recirculado hacia la vía glicolítica a través de la reacción catalizada por la glucosa fosfato isomerasa. En las siguientes velocidades de dilución, la recirculación desciende hasta la desaparición del ciclo a una velocidad de dilución de 0.5 h^{-1} . Es de relevancia destacar, que al aumentar la oxidación de la fuente de carbono en la vía de las pentosas, se produciría también un incremento en el poder reductor en forma de NADPH, lo cual estaría probablemente por arriba de las necesidades biosintéticas del microorganismo. Esto lo resolvería el microorganismo mediante la presencia de la transdeshidrogenasa, con lo cual el NADPH se transformaría en NADH. En *Escherichia coli*, se ha reportado la presencia de dos tipos de transdeshidrogenasa una de las cuales requiere de energía para su desempeño (Voordouw, et al., 1983). También se ha mostrado que existe una desigualdad en el grado de reducción intracelular, manifestada por un mayor grado de reducción de NADP(H) comparado con el de NAD(H), y que la presencia de un tipo u otro de transdeshidrogenasa depende del aumento o disminución de la concentración de cada uno de estos piridin-nucleótidos, sin que se vea alterada esta desigualdad (ibidem). Desde el punto de vista termodinámico, la

presencia de una transdeshidrogenasa no dependiente de energía se vería favorecida cuando se presentara un exceso de NADPH. Lo anterior justifica plenamente la inclusión de la reacción de la transdeshidrogenasa no dependiente de energía en la red metabólica propuesta para la cepa PB25. Es interesante mencionar que el aumento observado en la actividad oxidativa de la vía de las pentosas es congruente con un aumento comparativo en la actividad de las dos primeras enzimas de esta vía, observada por Poncc et al. (1998) en experimentos llevados a cabo con la cepa PB25 en cultivo por lote.

Por otro lado, con la cepa PB25 a una velocidad de dilución de 0.2 h^{-1} , se observó una mayor eficiencia en la transformación de carbono en biomasa, comparada con la observada por la cepa JM101, lo cual se vio reflejado en valores comparativamente más bajos de consumo específico de glucosa, en un rendimiento celular más alto, así como en una actividad oxidativa más baja. Esto último se tradujo en valores comparativamente más bajos de producción de CO_2 y consumo de oxígeno (ver Figuras 7a y 8ab). En este caso, la distribución de flujos de carbono fue significativamente diferente, con un aumento considerable del flujo de carbono hacia la vía de las pentosas, lo cual habría sido compensado en términos energéticos con una disminución sustancial del flujo de carbono hacia el ciclo de los TCA (ver Figura 23 y 24). Por otro lado, a velocidades de dilución de 0.3 y 0.35 h^{-1} los diferentes parámetros de fermentación fueron similares a los observados por la cepa JM101 a excepción de un valor comparativamente más bajo de consumo específico de oxígeno, observado a una velocidad de dilución de 0.3 h^{-1} (ver Figura 8). A una velocidad de 0.5 h^{-1} , los valores de rendimiento celular con la cepa PB25, fueron similares a los observados por la JM101 (ver Figura 7a), no obstante haberse obtenido una menor acumulación de ácido acético. Esto no se reflejó en valores específicos más altos de producción de CO_2 (ver Figura 8b), lo cual pudo deberse a una compensación provocada por la disminución de la actividad de la piruvato deshidrogenasa, en donde también se produce CO_2 (ver Figura 13 y 21). Es interesante hacer notar que a una velocidad de dilución de 0.5 h^{-1} , el ciclo de oxidación observado en la cepa PB25 se pierde, observándose valores positivos de flujo de carbono en la reacción catalizada por la glucosa fosfato isomerasa, con una disminución concomitante en el flujo de carbono hacia la vía de las pentosas (ver Figura 23). También es interesante puntualizar que la disminución de la

actividad del ciclo de los TCA a esta velocidad de dilución contribuyó a disparar la acumulación de ácido acético en la cepa PB25 (ver Figura 24).

Por otro lado, la mutación que porta la cepa PB25 en las piruvato cinasas, dos importantes enzimas de la vía glicolítica, permitió visualizar la manera en que el metabolismo celular es capaz de redistribuirse para balancear necesidades anabólicas y catabólicas y dar como resultados indicadores similares. Como puede verse en las gráficas de distribución de flujos de carbono, a comportamientos similares en los parámetros de fermentación, correspondieron estados metabólicos completamente diferentes, es decir, ante la presencia de un bloqueo en la actividad de las piruvato cinasas, el microorganismo fue capaz de reorganizar el metabolismo celular para satisfacer requerimientos anabólicos y catabólicos. Esto puede verse mas claramente a velocidades de dilución de 0.3 y 0.35 h⁻¹. El beneficio inmediato de esta reorientación de los flujos de carbono intracelular, fue una disminución sustancial en la capacidad de la célula para acumular ácido acético.

Es interesante puntualizar el papel que las piruvato cinasas y el PEP jugaron en el comportamiento de las dos mutantes ensayadas. En el caso de la cepa PB12, no se observó un efecto determinante del PEP como elemento regulador del flujo de carbono, particularmente a velocidades de dilución menores de 0.5 h⁻¹. Si embargo, a esta velocidad sí pudo observarse un aumento del flujo de carbono hacia la vía de las pentosas comparado por el observado por la cepa progenitora, probablemente debido al efecto regulador del PEP o a un aumento en la expresión de algunos de los genes de la vía de las pentosas. Tal como se esperaba, ante la ausencia de actividad de las piruvato cinasas en la cepa PB25, se observó un efecto regulador del PEP sobre el flujo de carbono en la vía glicolítica. Dicho efecto transformó a la vía de las pentosas en la principal alternativa para canalizar el flujo de carbono, tanto para fines catabólicos como anabólicos.

En relación con el efecto regulador del PEP, es relevante destacar los resultados reportados por Ponce et al. (1998). Las mediciones de la actividad de las piruvato cinasas en la cepa PB12, mostraron una disminución significativa de con relación a la observada por la cepa JM101. De acuerdo con esto a velocidades de dilución menores a 0.5 h⁻¹, el patrón de flujos

no se modificó porque la actividad desplegada por las piruvato cinasas, fue suficiente para procesar el PEP proveniente de la actividad de la enolasa. Sin embargo a una velocidad de dilución de 0.5 h^{-1} , se habría observado un aumento en el flujo de carbono hacia la vía de las pentosas debido al efecto regulador del PEP, el cual se encontraría en exceso debido a una menor actividad de las piruvato cinasas en un fondo PTS, comparada con la observada en un fondo silvestre, lo cual concuerda bastante bien con los resultados mostrados por Ponce et al. (1998).

8.0 CONCLUSIONES

4.- Los resultados obtenidos en cultivo continuo en relación con la distribución de los flujos de carbono en el metabolismo central y su influencia sobre la acumulación de ácido acético, permitieron observar diferencias claras entre la mutante PB25 y su progenitora. Sin embargo, al comparar la cepa PB12 con la progenitora, las diferencias no fueron tan claras.

(a) En el caso de la PB12, la red metabólica propuesta no alcanza a explicar completamente el comportamiento cinético. Las diferencias observadas en la acumulación de ácido acético, solo fueron explicadas marginalmente en algunos casos, por la red metabólica propuesta. La disminución en la acumulación de ácido acético observada a una velocidad de dilución de 0.35 h^{-1} pudo deberse, de acuerdo al patrón de flujos calculado, a un aumento en el flujo de carbono hacia el ciclo de los TCA. Sin embargo, la diferencia observada a una velocidad de dilución de 0.5 h^{-1} , pudo deberse mas bien a un aumento del flujo de carbono hacia la vía de las pentosas.

(b) Los resultados obtenidos con la cepa PB25, sugieren que la producción de ácido acético disminuyó significativamente debido a la orientación del flujo de carbono, principalmente hacia la vía de las pentosas, lo cual incluyó la formación de un ciclo de oxidación en esta parte del metabolismo a través de la reacción catalizada por la glucosa fosfato isomerasa, actuando en forma reversible.

9.0 REFERENCIAS

- Atkinson T., B.J. Capel & R. Sherwood. 1992. Recombinant DNA techniques in production. In: Safety in Industrial Microbiology. C. Collins & A.J. Beale, Eds. Butterworth-Heinemann, Oxford.
- Aristidou A.A., K.Y. San, G.N. Bennett. 1994. Modification of central metabolic pathway in *Escherichia coli* to reduce acetate accumulation by heterologous expression of the *Bacillus subtilis* acetolactate synthase gene. *Biotechnol. & Bioeng.* **44**: 944-951.
- Aristidou A.A., K.Y. San, G.N. Bennett. 1995. Metabolic engineering of *Escherichia coli* to enhance recombinant protein production through acetate reduction. *Biotechnol. Prog.* **11**: 475-478
- Bailey J.E., S. Birnbaum, J.L. Galazzo, C. Khosla & J.V. Shanks. 1990. Strategies and challenges in metabolic engineering. In: Biochemical Engineering VI. W.E. Goldstein, D. Dibioasio & H. Pedersen, Eds. The New York Academy of Sciences, New York.
- Bailey J.E. 1991. Toward a science of metabolic engineering. *Science*, **252**: 1668-1675.
- Berry A. 1996. Improving production of aromatic compounds in *Escherichia coli* by metabolic engineering. *Tibtech.* **14**: 250-256.
- Bouvet, O.M. & P.A. Grimont. 1987. Diversity of the phosphoenolpyruvate/glucose phosphotransferase system in the Enterobacteriaceae. *Ann. Inst. Pasteur/Microbiol.* **138**, 3-13.
- Chou C.H., G.N. Bennett & K.Y. San. 1994. Effect of modified glucose uptake using genetic engineering techniques on high-level recombinant protein production in *Escherichia coli* dense cultures. *Biotechnol. & Bioeng.* **44**: 952-960

- Cronan J.E. & LaPorte D. 1996. Tricarboxylic acid cycle and Glyoxylate bypass. In: *Escherichia coli* and *Salmonella*, Vol 1, 2nd ed, F.C. Neidhardt Ed., ASM Press, Washington, DC.
- Dedhia N.N., T. Hottiger, J.E. Bailey. 1994. Overproduction of glycogen in *Escherichia coli* blocked in the acetate pathway improves cell growth. *Biotechnol. Bioeng.* **44**: 132-139
- Delgado J. & J.C. Liao. 1997. Inverse flux analysis for reduction of acetate excretion in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* **13**: 361-367.
- Dias-Ricci J.C., L. Regan, J.E. Bailey. 1991. Effect of alteration of the acetic acid synthesis pathway on the fermentation pattern of *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* **38**: 1318-1324
- Doelle H.W., K.N. Ewings & N.W. Hollywood. 1982. Regulation of glucose metabolism in bacterial systems. In: *Advances in Biochemical Engineering*, Vol. 23. A. Fichter, Ed. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.
- El-Mansi E.M. & W.H. Holms. 1989. Control of carbon flux to acetate excretion during growth of *Escherichia coli* in batch and continuous culture. *J. Gen. Microbiol.* **135**: 2875-2883
- Farmer W.R. & J. Liao. 1997. Reduction of acetate production by *Escherichia coli*. *App. Environ. Microbiol.* **63**: 3205-3210
- Flores N., J. Xiao, A. Berry, F. Bolivar & F. Valle. 1996. Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.* **14**: 620-623
- Fraenkel D.G. 1996. Glycolysis. In: *Escherichia coli* and *Salmonella*, Vol 1, 2nd ed, F.C. Neidhardt Ed., ASM Press, Washington, DC.

Goel A., J. Ferrance, J. Jeong & M. Ataai. 1995. Suppressed acid formation by co-feeding of glucose and citrate in *Bacillus* cultures: Emergence of pyruvate kinase as a potential metabolic engineering site. *Biotechnol. Prog.* 11: 380-385.

Gosset, G., J. Yong-Xiao & A. Berry. 1996. A direct comparison of approaches for increasing carbon flow to aromatic biosynthesis in *Escherichia coli*. *J. Ind. Microbiol.* 17: 47-52.

Gschaedler A., N.T. Le & J. Boudrant. 1994. Glucose and acetate influences on the behavior of the recombinant strain *Escherichia coli* HB 101 (GAPDH). *J. Ind. Microbiol.* 13: 225-232.

Han K.H., C. Lim, J. Hong. 1991. Acetic acid formation in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 39: 663-671

Holms W.H. 1986. The central metabolic pathways of *Escherichia coli*: Relationship between flux and control at a branch point, efficiency of conversion to biomass, and excretion of acetate. In: B.L. Current Topics in Cellular Regulation, Vol 28. Horecker & E.R. Stadtman, Eds. Academic Press, New York.

Ingram L.O. & T. Conway. 1988. Expression of different levels of ethanologenic enzymes from *Zymomonas mobilis* in recombinant strains of *Escherichia coli*. *App. Environ. Microbiol.*, 54: 397-404.

Kessler D. & J. Knappe. 1996. Anaerobic dissimilation of pyruvate. In: *Escherichia coli* and *Salmonella*, Vol 1, 2nd ed, F.C. Neidhardt Ed., ASM Press, Washington, DC.

Kleman G.L. & W.R. Strohl. 1994. Acetate metabolism by *Escherichia coli* in high cell density fermentation. *App. Environ. Microbiol.*, 60: 3952-3958.

Koh BT, Nakashimada U, Pfeiffer M, Yap MGS (1992) Comparison of acetate inhibition on growth of host and recombinant *E. coli* K12 strains. *Biotechnol. Let.* 14: 1115-1118

Konstantinov KM, Kishimoto M, Seki T, Yoshida T (1990) A balanced DO-stat and its application to the control of acetic acid excretion by recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 36: 750-758

Lischke H.H.L., L. Brandes, X. Wu & K. Schügerl. 1993. Influence of acetate on the growth of recombinant *Escherichia coli* JM103 and product formation. *Bioproc. Eng.* 9: 155-157.

Luli G.W. & W.R. Strohl. 1990. Comparison of growth, acetate production and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. *App. Environ. Microbiol.* 56: 1004-1011.

Majewski R.A. & M.M. Domach 1990. Simple and constrained-optimization view of acetate overflow in *Escherichia coli*. *Biotech. Bioeng.* 35: 732-738.

Marison I.W. & U. von Stockar. 1986. The application of a novel heat flux calorimeter for studying growth of *Escherichia coli* W in aerobic batch culture. *Biotechnol. Bioeng.* 28: 1780-1793.

Martin J.F., R. Santamaría, H. Sandoval, G. Del Real, L.M. Mateos J.A. Gil & A. Aguilar. 1987. Cloning systems in amino acid-producing corynebacteria. *Bio/Technol.* 5: 137-146.

Meyer H.P., C. Leist & A. Fiechter. 1984. Acetate formation in continuous culture of *Escherichia coli* K12 D1 on defined and complex media. *J. Biotechnol.* 1: 355-358

Neijssel O.M., M.J. Teixeira de Matos & D.W. Tempest. 1996. Growth yield and energy distribution. In: *Escherichia coli and Salmonella*, Vol 1, 2nd ed, F.C. Neidhardt Ed., ASM Press, Washington, DC.

Pan J.G., J.S. Rhee & J.M. Lebeault. 1987. Physiological constraints in increasing biomass concentration of *Escherichia coli* B in fed-batch culture. *Biotechnol. Let.* **9**: 89-94.

Ponce E., N. Flores, A. Martínez, F. Valle & F. Bolivar. 1995. Cloning of the two pyruvate kinase isoenzyme structural genes from *Escherichia coli*: The relative roles of these enzymes in pyruvate biosynthesis. *J. of Bacteriol.* **177**: 5719-5722

Ponce E., N. Flores, A. Martínez, F. Valle & F. Bolivar. 1998. Stimulation of glucose catabolism through the pentose pathway by the absence of the two pyruvate kinase isoenzymes in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* **58**: 292-295.

Postma P.W., W.J. Lengeler, G.R. Jacobson. 1993. Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**: 543-594.

Postma P.W., W.J. Lengeler, G.R. Jacobson. 1996. Phosphoenolpyruvate: Carbohydrate phosphotransferase system. In: *Escherichia coli* and *Salmonella*, Vol 1, 2nd ed, F.C. Neidhardt Ed., ASM Press, Washington, DC.

Reisenberg D, Menzel K, Schulz V, Schumann K, Veith G, Zuber G, Knorre WA (1990) High cell density fermentation of recombinant *Escherichia coli* expressing human interferon alpha 1. *App. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 77-82

Sahm H. 1991. Metabolic design in amino acid-producing bacteria. In: *Biochemical Engineering-Stuttgart*. M. Reuss, H. Chmiel, E.D. Gilles & H.J. Knackmuss, Eds. Gustav Fischer, Stuttgart, New York.

Sambrock, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. 1989 *Molecular cloning. A laboratory manual*. CSH Laboratory Press.

Stephanopoulos G. 1994. Metabolic engineering. *Curr. Op. Biotechnol.* **5**: 196-200

Stephanopoulos G. & J. Sinskey. 1993. Metabolic engineering. Methodologies and future prospects. *Tibtech*. 11: 392-396.

Stephanopoulos G. & J.J. Vallino. 1991. Network rigidity and metabolic engineering in metabolite overproduction. *Science*, 252: 1675-1681.

Strandberg L, Enfors SO (1991) Batch and fed batch cultivations for the temperature induced production of a recombinant protein in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* 13: 609-614

Sun W.J., C. Lee, H.A. George, A.L. Powell, M.E. Dahlgren, R. Greasham & C.H. Park. 1993. Acetate inhibition on growth of recombinant *E. coli* and expression of fusion protein TGF -PE40. *Biotechnol. Lett.* 15: 809-814

Swartz J. R. 1996. *Escherichia coli* recombinant DNA technology. In: *Escherichia coli* and *Salmonella*, Vol 1, 2nd ed, F.C. Neidhardt Ed., ASM Press, Washington, DC.

Valle F., E. Muñoz, E. Ponce, N. Flores & F. Bolivar. 1996. Basic and applied aspects of metabolic diversity: the phosphoenolpyruvate node. *J. Ind. Microbiol.* 17: 458-462.

Varma A. & B.O. Palsson. 1994. Stoichiometric flux balance models quantitatively predict growth and metabolic by-product secretion in wild type *Escherichia coli* W3110. *App. Environ. Microbiol.* 60: 3724-3731.

Varma A. & B.O. Palsson. 1994. Metabolic flux balancing. Basic concepts, scientific and practical use. *Bio/Technol.* 12: 994-998.

Voordouw A., S. M. van der Vies & A.P.N. Themmen. 1983. Why are two different types of pyridin nucleotide transdeshydrogenase found in living organisms?. *J. Biochem.* 131: 527-533.

Wolf R.E. Jr., D.M. Prather & F.M. Shea. 1979. Growth-rate-dependent alteration of 6-phosphogluconate dehydrogenase and glucose 6-phosphate dehydrogenase levels in *Escherichia coli* K-12. *J. of Bacteriol.* **139**: 1093-1096.

Kinetic characterization in batch and continuous culture of *Escherichia coli* mutants affected in phosphoenolpyruvate metabolism: differences in acetic acid production

R. Sigüenza¹, N. Flores¹, G. Hernández¹, A. Martínez¹, F. Bolívar¹ and F. Valle^{2,*}

¹Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 510-3, Cuernavaca, Morelos 62271, México

²Genencor International Inc., 925 Page Mill Road, Palo Alto, CA 94304-1013, USA

* Author for correspondence: Fax: 650 845-6509, E-mail: fvalle@genencor.com

Received 4 January 1999; accepted 6 May 1999

Keywords: Acetic acid production, carbon metabolism, continuous culture, *Escherichia coli*, metabolic engineering

Summary

The growth kinetics of an *Escherichia coli* wild type strain and two derivative mutants were examined in batch cultures and in glucose-limited chemostats. One mutant (PB12) had an inactive phosphotransferase transport system and the other (PB25) had interrupted *pykA* and *pykF* genes that code for the two pyruvate kinase isoenzymes. In both batch and continuous culture, important differences in acetic acid accumulation and other metabolic activities were found. Compared to the wild type strain, we observed a reduction in acetic acid accumulation of 25 and 80% in PB25 and PB12 strains respectively, in batch culture. Continuous culture experiments revealed that compared to the other two strains, PB25 accumulated less acetic acid as a function of dilution rate. In continuous cultures, oxidoreductase metabolic activities were substantially affected in the two mutant strains. These changes in turn were reflected in different levels of biomass and CO₂ production, and in oxygen consumption.

Introduction

Acetic acid production by *Escherichia coli* strains has been a serious drawback for the commercial production of recombinant proteins and chemicals (Han *et al.* 1991; Sun *et al.* 1993; Gschaedler *et al.* 1994). As an uncoupler of the energetic process, acetic acid has toxic effects on cell growth. In addition, it has a negative impact on the yield of products (Koh *et al.* 1992; Lischke *et al.* 1993). Several authors have discussed the acetic acid accumulation as a carbon overflow mechanism. Apparently, under certain growth conditions the TCA cycle is not capable of completely managing the pyruvate fluxes derived from pyruvate kinase (PK) activities and the phosphotransferase system (PTS). This is particularly true at high growth rates (Majewski & Domach 1990; Han *et al.* 1991).

PTS is the most important mechanism for glucose internalization in *Escherichia coli* and in many other *Enterobacteriaceae* (Bouvet & Grimont 1987). This mechanism couples glucose transport to its phosphorylation, by transferring the high-energy phosphoryl bond from phosphoenolpyruvate (PEP) to the sugar molecule (see Figure 1). The phosphotransferase system is extremely efficient and in theory, it could concentrate glucose up to 10⁶-fold against a concentration gradient (Parr & Saier 1992). The glycolytic pathway produces

two moles of PEP per mole of glucose assimilated, and because the PTS uses one of them, only one molecule of PEP is left for the rest of the reactions that require PEP directly. Two important reactions of the central metabolism consume PEP. One is catalysed by phosphoenolpyruvate carboxylase (Ppc), which converts PEP into oxaloacetate (see Figure 1). In the other reaction, pyruvate kinase (PK) converts PEP into pyruvate. In the case of *Escherichia coli* there are two PK isoenzymes, PKA and PKF.

As it stands, the present design of central metabolism in gram negative bacteria complicates the overproduction of compounds that require PEP for their synthesis, and this is why PTS and PK isoenzymes and their respective structural genes are important targets for metabolic engineering. Recently, our group has shown that the use of an alternative glucose transport system that does not consume PEP for glucose phosphorylation, and the absence of both PK enzymes, positively affect the formation of aromatic compounds in *Escherichia coli* (Berry 1996; Flores *et al.* 1996; Gosset *et al.* 1996). Furthermore, the reaction catalyzed by the PK isoenzymes has been suggested as an important target for metabolic engineering to diminish acetate formation (Goel *et al.* 1995).

In the present study we report the kinetic characterization of, and the production of acetic acid in, two

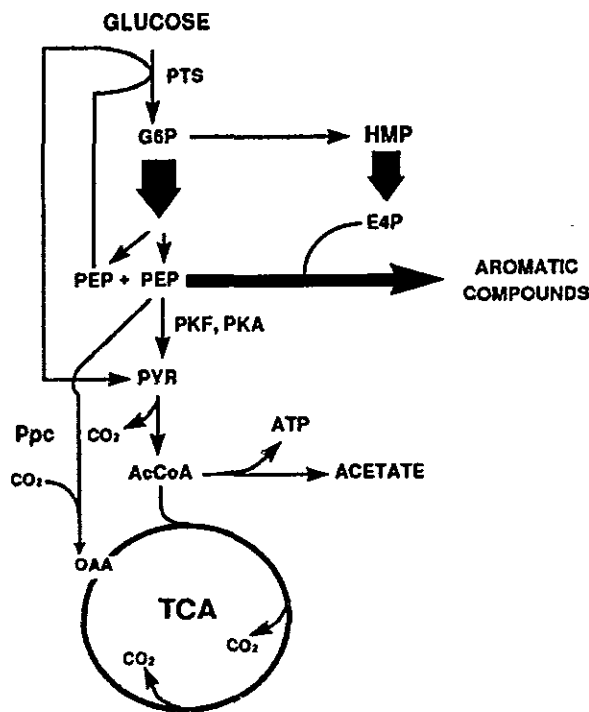


Figure 1. Scheme showing some of the metabolic pathways involved in glucose assimilation and in the formation of certain products in *Escherichia coli*. The heavy arrows indicate that multiple enzymatic reactions are involved. G6P: Glucose-6-phosphate; PEP: Phosphoenolpyruvate; HMP: monophosphate shunt; E4P: Erythrose-4-phosphate; PYR: Pyruvate; AcCoA: Acetyl-CoA; Ppc: Phosphoenolpyruvate carboxylase; TCA: Tricarboxylic acids cycle; PTS: Phosphotransferase transport system; PKA and PKF: the two pyruvate kinase isoenzymes present in *Escherichia coli*.

isogenic *Escherichia coli* mutant strains. One mutant transports glucose by a non-PTS mechanism, using ATP for glucose phosphorylation (Flores *et al.* 1996). In the other strain, the two PK isoenzymes have been eliminated. This leaves PTS as the only source of pyruvate (Ponce *et al.* 1995, 1998). We believe this characterization will contribute to a better understanding of the role of these enzymes in carbon metabolism and will also provide better tools for metabolic engineering in *Escherichia coli*.

Materials and Methods

Bacterial strains

The mutant strains used in this work were constructed in our laboratory and they are derivatives of *Escherichia coli* JM101 *supE thi Δ(lac⁻proAB)(F' traD36 proAB lacI^qZΔM15)*. PB12 is a $\Delta(ptsH-I-crr)::kan$ Glc⁺ derivative (Flores *et al.* 1996) and PB25 is a *pykA::kan pykF::cam* derivative (Ponce *et al.* 1995).

Media and inoculum

M9 medium was utilized for batch and continuous culture experiments; inocula were prepared in Luria

Broth (Sambrook *et al.* 1989). The starting cultures were prepared by inoculating 3 ml of LB from a frozen cell stock, kept in 10% glycerol at -70°C , and incubating overnight in a G25 orbital incubator shaker (New Brunswick Inc. New Brunswick, NJ), at 37°C and 300 rev/min. One ml of the overnight culture was centrifuged, washed with a 10 mM NaCl, transferred to a 500 ml flask with 50 ml of M9 medium, and incubated for 12 h at 37°C and 300 rev/min. A portion of the culture was used to inoculate the fermentor to an initial optical density at 600 nm (OD_{600}) between 0.05 and 0.1.

Fermentations

The batch and continuous culture experiments were performed in a 2-l fermentor (LSL BiolaFitte, Inc. Princeton, NJ) with 1.2 and 0.78 l of operation volume respectively. The data from these experiments were reported as representative runs and were always compared for accuracy with at least one replicated trial. Continuous culture experiments were initiated from batch cultures growth to late exponential phase. In the different dilution rates tested, the steady state was achieved after at least six residence times. Constant signals of q_{O_2} , q_{CO_2} , dissolved oxygen, and OD_{600} were used to measure stability of the cultures. Once a steady state was obtained in each one of the cultures, five samples were taken in 3 to 4 h intervals each one to determine residual glucose, biomass, glycogen and organic acids concentrations (see below). All cultivations were done at 37°C ($\pm 0.003\%$); pH 7 ($\pm 0.007\%$); with an aeration of 1 VVM; pH was controlled with the automatic addition of a 1 M NH_4OH . Off-gas analysis for oxygen and carbon dioxide were performed on-line by a MGA-1200 mass spectrometer (Perkin-Elmer, Pomona, Calif.).

Analytical methods

During batch experiments, the biomass was calculated from OD measurements, using a calibration curve (1 OD_{600} unit = 0.36 g/l). In continuous culture experiments, the dry weight was determined by centrifuging 10 ml aliquots for 10 min in an Eppendorf centrifuge (Brinkmann, Inc., Westbury, NY). The pellets were suspended in 10 mM NaCl and centrifuged again. All the samples were dried for 24 h, in a vacuum oven at 90°C . Residual glucose in the media was determined using a multiple enzymatic analyzer Ektachem DT60 II (Kodak, Rochester, NY). Glycogen was determined as reported by Förberg *et al.* (1988). Organic acids were quantified by HPLC (Waters, Millipore Corp. Milford, MA) using an Aminex HPX-87H 300×7.8 mm column (Bio-Rad, Hercules, CA) at 60°C , H_2SO_4 5 mM as eluant, with a flow rate of 0.5 ml/min.

Results

Batch culture experiments

We used batch cultures to compare several growth parameters of the JM101 strain and its two derivatives PB12 and PB25 wherein the PEP metabolism had been affected by specific mutations. These three strains exhibit different growth rates (Figure 2). In addition, the PB25 culture reached a different final biomass concentration compared to the JM101 and PB12 cultures. Differences between the strains were also found in the level of glucose consumption. Interestingly, a substantial change in the rate and level of acetate accumulated by these strains was also observed. Furthermore,

acetate consumption was also detected in JM101 and PB25 cultures, after almost all the glucose was exhausted and growth ceased. In contrast, in PB12 cultures, acetate was only detected at later time points and never accumulated to more than 0.05 g/l (see Figure 2). Other organic acids (lactate, pyruvate, and succinate), as well as the storage carbohydrate glycogen, were not detected in significant concentrations in the three strains examined (data not shown).

The data generated by these experiments were utilized to calculate specific rates and yields, which are presented in Table 1. The highest specific growth rate was obtained in the JM101 culture, whereas PB25 and PB12 cultures showed respectively, a 20 and 40% decreases in their growth rates as compared to the parental JM101. A higher biomass yield was observed in the PB12 culture, in accordance with the lowest acetate accumulation observed for this strain. Interestingly, when compared with JM101, the PB25 strain showed a lower biomass yield, despite having accumulated less acetate. These results suggest that in the PB25 strain, more substrate was diverted away from biomass to other metabolic routes. In this sense, we observed that total CO₂ production was higher in PB25 cultures than in the other two strains (data not shown). In agreement with these results, it has been previously determined (Ponce *et al.* 1998), that in the PB25 strain, the pentose pathway increases its participation in glucose catabolism.

Different values of specific glucose consumption rate and acetate production were observed in the tested strains. The highest specific glucose consumption rate was observed in JM101, while the lowest was found in the PB12 culture. The glucose consumption value for the PB25 strain was very similar to the one obtained for the JM101 strain. Regarding acetate production, the PB25 strain showed the highest specific production rate. It has been pointed out that in *Escherichia coli* cultures, acetate accumulation is a direct function of growth rate (Meyer *et al.* 1984; El-Mansi & Holms 1989). Although the PB12 strain showed a consistent behaviour in this respect, it was not the case for the PB25 strain which compared with the other strains, showed a higher production of acetate per unit of biomass (see Table 1).

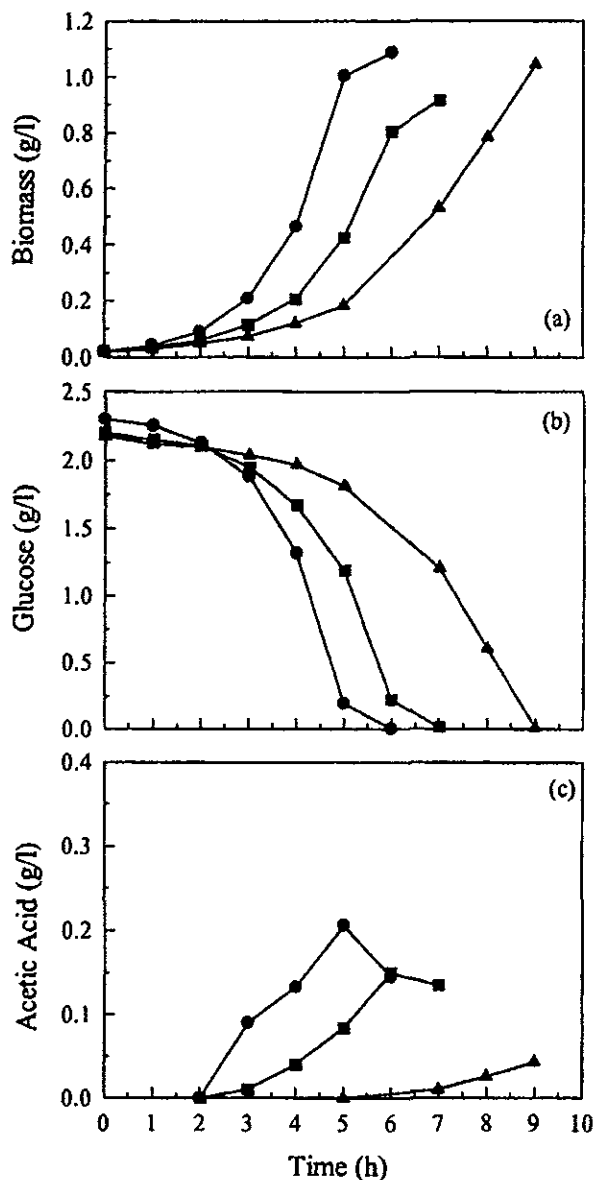


Figure 2. Cell growth (a), glucose consumption (b) and acetic acid accumulation (c) measurements for the three *Escherichia coli* strains tested in batch culture experiments, using M9 medium with glucose (2 g/l) as the only carbon source. Symbols: (●) JM101, (▲) PB12, (■) PB25. Data from one representative run, compared for accuracy with at least one duplicated experiment

Table 1. Results from batch culture experiments with the three *E. coli* strains examined^a.

Strain	μ_{\max} (h ⁻¹)	$y_{X/S}^b$ (g/g)	$y_{HAc/X}^b$ (g/g)	q_S^c (g/g/h)	q_{HAc}^c (g/g/h)
JM101	0.78	0.47	0.14	1.67	0.112
PB12	0.47	0.54	0.064	0.87	0.03
PB25	0.62	0.4	0.197	1.54	0.121

^a These calculations are derived from one representative run and compared for accuracy with at least one replication.

^b Biomass yield on consumed glucose and acetic acid production by produced biomass, calculated from the exponential phase data.

^c Specific rates of glucose consumption and acetic acid production, from the exponential phase data

Based on these results and to obtain a deeper insight into the kinetic behaviour of these strains, we used glucose-limited continuous cultures to obtain steady states at different growth rates for each strain, and to measure the acetate production rates under these conditions.

Continuous culture experiments

Considering that the mutations incorporated into the PB12 and PB25 strains involved glucose transport, PEP metabolism and pyruvate supply, the first parameter that we wanted to study on these strains was the yield, that is, the amount of biomass produced per gram of glucose consumed. In the range of dilution rates tested, the JM101 strain showed a slight decrease in the yield as the growth rate increased. This behaviour was more pronounced in strain PB25, while in PB12, the yield increased as the dilution rate was also increased (see Figure 3a). As can be seen in Figure 3b, no acetate was produced at the 0.2 and 0.3 h^{-1} dilution rates by any of the cultures. However at a dilution rate of 0.35 h^{-1} , the production of acetate by the PB12 culture was 40% lower than in the JM101 culture. Interestingly, at this dilution rate, the PB25 culture did not produce acetate. All the cultures produced acetate at a dilution rate of

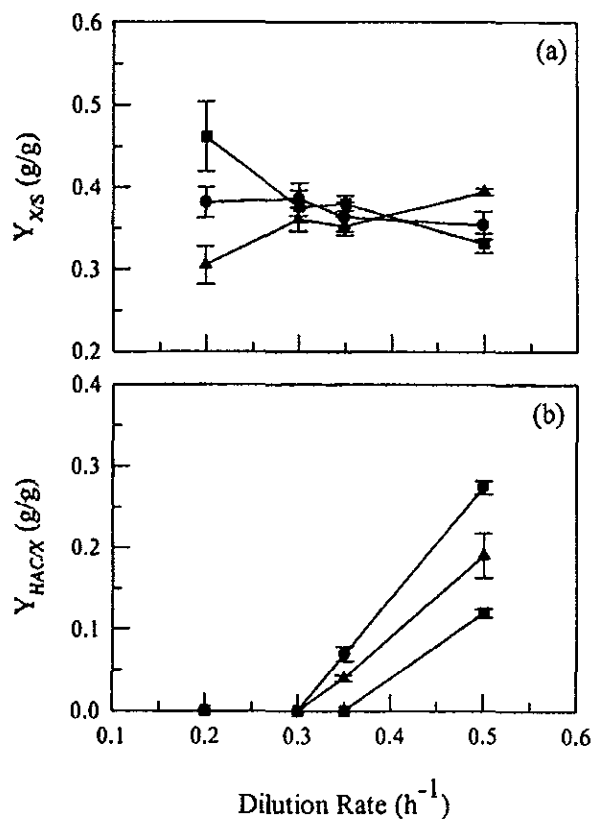


Figure 3. Determination of the yields of biomass (a) and acetic acid (b) in strains JM101 (●), PB12 (▲) and PB25 (■) in continuous cultures, at different dilution rates. $Y_{X/S}$, grams of biomass produced by grams of consumed glucose; $Y_{HAc/X}$, grams of acetic produced by grams of biomass. These data were computed from average values of five samples taken at steady state

0.5 h^{-1} ; however, at this growth rate and when compared with JM101, the PB12 and PB25 cultures produced 30% and 55% less acetate, respectively (see Figure 3b). The strains examined under these conditions did not show significant accumulation of other organic acids (lactate, pyruvate and succinate) or glycogen as a function of dilution rate (data not shown).

As expected, the specific glucose consumption rate increased with the dilution rate, although each culture exhibited a different slope (see Figure 4a). As shown in Figure 4b, the specific CO_2 production rate of the three strains showed a linearly increasing trend with dilution rate. At 0.2 h^{-1} and when compared to JM101, the PB12 culture showed a slightly higher specific CO_2 production rate but the corresponding value was significantly lower

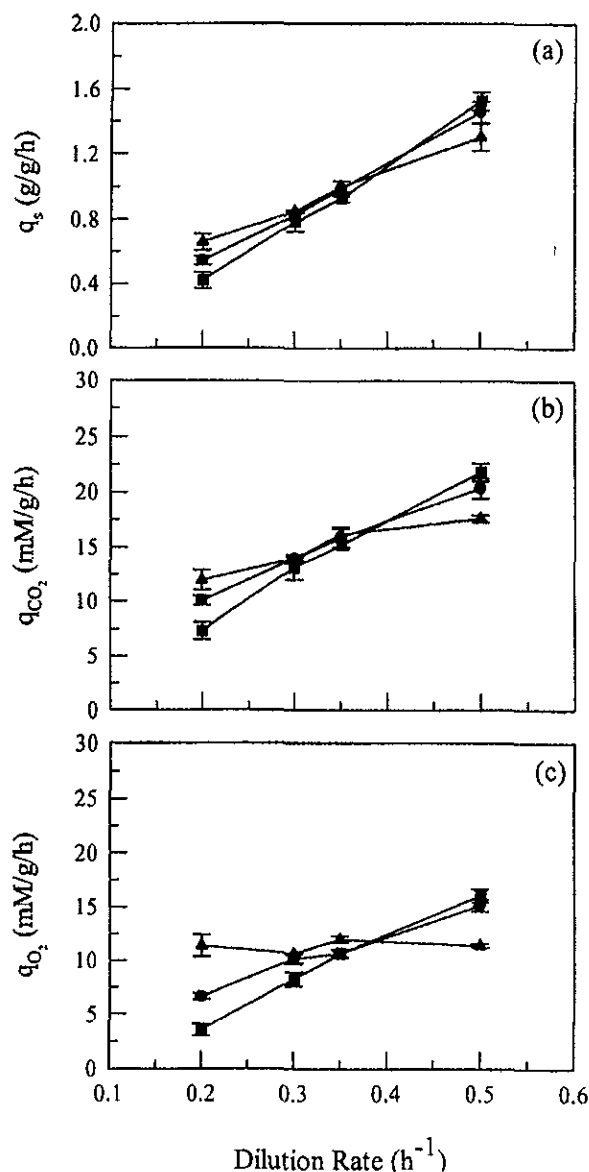


Figure 4. Specific rates showed by the three *Escherichia coli* strains tested in continuous culture experiments at different dilution rates: q_s , specific glucose consumption rate (a); q_{CO_2} , specific CO_2 production rate (b); q_{O_2} , specific oxygen consumption rate. Symbols: (●) JM101, (▲) PB12 and (■) PB25. These data were computed from average values of five samples taken at steady state

than that for JM101 at 0.5 h^{-1} . In the PB25 culture and when compared to JM101, the specific CO_2 production rate was slightly lower at 0.2 h^{-1} , whereas at 0.5 h^{-1} , it was nearly the same as in JM101 (see Figure 4b). Regarding the specific oxygen uptake rate, in both JM101 and PB25 cultures, as expected, a linear increase with growth rate was observed. Interestingly, the PB12 culture showed a relatively constant specific oxygen consumption rate. The differences observed on specific rates of CO_2 production and oxygen consumption for all the strains, clearly indicates different oxidative-reductive metabolic activities.

Discussion

The *Escherichia coli* mutant strains PB12 and PB25 were constructed in an attempt to modify the carbon flux distribution at the PEP node. In the PB12 strain, glucose is transported and phosphorylated by the action of the galactose permease and glucokinase, respectively (Flores *et al.* 1996). This new metabolic strategy implies that in this strain, no PEP is consumed directly for glucose phosphorylation, and that the formation of pyruvate is not necessarily coupled to glucose transport. In addition, due to the multiple regulatory roles that PTS plays in different processes, important changes in cell physiology can be envisaged on this strain. Furthermore, it has been reported by our group that a strain with a similar phenotype to PB12 was able to produce more aromatic compounds, suggesting an increase in the metabolic availability of PEP (Flores *et al.* 1996, Gosset *et al.* 1996). On the other hand, the PK reaction is the last step of the glycolytic pathway and is an important source of pyruvate (Ponce *et al.* 1995, 1998). Our group has also elucidated that an *Escherichia coli* strain devoid of PK activity, carrying a PTS deletion, increases the availability of PEP to produce aromatic compounds (Gosset *et al.* 1996).

The data obtained from batch and continuous cultures of PB12 and PB25 strains show important differences in the carbon flux distributions when compared to the parental JM101 strain. In the two mutants, acetate production was substantially lower. This result may be associated with a decreasing carbon flux into pyruvate. In general, it is accepted that in *Escherichia coli* aerobic cultures, acetate is produced after a certain growth rate (i.e., carbon flux through central metabolism) is achieved, when the TCA cycle is saturated and it is unable to manage the flux that glycolysis delivers (Majewski & Domach 1990). Under these circumstances, the excess of carbon flux is directed towards the formation of acetate. As shown in Figure 1, this strategy also provides an extra source of ATP. In this scenario, the PEP node plays an important role acting as a distribution point of carbon to produce building blocks for growth or for the synthesis of organic acids (see Figure 1). On the other hand, the metabolic activities of

the central pathways are modulated to satisfy the carbon and energy requirements for growth. These activities are reflected in biomass and CO_2 production, as well as in oxygen consumption. At dilution rates below the onset of acetate production, an oxidative metabolism predominates and the substrate is transformed only into biomass and CO_2 , whereas at dilution rates above the onset both oxidative and fermentative metabolisms occur, with the consequent production of biomass, CO_2 and acetate (Meyer *et al.* 1984). Interestingly, different metabolic trends were observed in continuous cultures with the three tested strains. At 0.2 h^{-1} , PB12 when compared to the other strains, showed a much higher metabolic activity, which was indicated by higher values of CO_2 production and oxygen consumption. On the contrary, at 0.5 h^{-1} , the PB12 culture showed a lower metabolic activity (i.e., lower rates for CO_2 production and oxygen consumption rate); however, despite these changes, a higher biomass yield was observed at this dilution rate. This was perhaps due to a more efficient utilization of the carbon from glucose as reflected by the lower CO_2 production. The fact that in PB25 cultures, acetate was still produced at 0.5 h^{-1} , could indicate that the pyruvate supplied by PTS, was enough to overflow the TCA cycle. Furthermore, the fact that the onset of acetate production in JM101 and PB12 strains was the same (0.35 h^{-1}) (see Figure 3b), suggests that this strain has been able to regain enough flux to pyruvate and overflow the TCA cycle. In this sense, we have not identified all the mutations that occurred in PB12. However, we do know that in this strain, the glucokinase enzyme (Glk) is overproduced and glucose is transported through the galactose permease (GalP) (Flores *et al.* 1996; unpublished results). Under this new scenario, glucose flux through GalP and Glk depends on the pull exerted by the glycolytic enzymes. It is evident from the results reported in this paper that none of the mutations present in the PB12 strain affected the onset of acetate formation.

Finally, we believe that the characterization of these mutants, which have been already utilized for the overproduction of aromatic compounds (Flores *et al.* 1996; Gosset *et al.* 1996), will contribute in the design of better strategies for the production of other important molecules in *Escherichia coli*.

Acknowledgements

We would like to thank Dr Rodolfo Quintero and Dr Guillermo Gosset for a critical review of the manuscript, and Mercedes Enzaldo for technical support. This investigation was supported by grants 25375-N from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México, IN206696 from DGAPA-UNAM, México, and Genecor International. Our thanks are also due to Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, for providing an scholarship to one of us (R.S).

References

- Berry, A. 1996 Improving production of aromatic compounds in *Escherichia coli* by metabolic engineering. *Trends in Biotechnology* **14**, 250–256.
- Bouvet, O.M. & Grimont, P.A. 1987 Diversity of the phosphoenolpyruvate/glucose phosphotransferase system in the Enterobacteriaceae. *Annales de l'Institut Pasteur/Microbiology* **138**, 3–13.
- El-Mansi, E.M. & Holms, W.H. 1989 Control of carbon flux to acetate excretion during growth of *Escherichia coli* in batch and continuous culture. *Journal of General Microbiology* **135**, 2875–2883.
- Flores, N., Xiao, J., Berry, A., Bolivar, F. & Valle, F. 1996 Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology* **14**, 620–623.
- Förberg, C., Eliaeson, T. & Häggström, L. 1988 Correlation of theoretical and experimental yields of phenylalanine from non-growing cells of a *rec Escherichia coli* strain. *Journal of Biotechnology* **7**, 319–332.
- Goel, A., Lee, J., Domach, M.M. & Attai, M.M. 1995 Suppressed acid formation by cofeeding of glucose and citrate in *Bacillus* cultures: Emergence of pyruvate kinase as a potential metabolic engineering site. *Biotechnology Progress* **11**, 380–385.
- Gosset, G., Yong-Xiao, J. & Berry, A. 1996 A direct comparison of approaches for increasing carbon flow to aromatic biosynthesis in *Escherichia coli*. *Journal of Industrial Microbiology* **17**, 47–52.
- Gschaedler, A., Le, N.T. & Boudrant, J. 1994 Glucose and acetate influences on the behavior of the recombinant strain *Escherichia coli* HB 101 (GAPDH). *Journal of Industrial Microbiology* **13**, 225–232.
- Han, K.H., Lim, C. & Hong, J. 1991 Acetic acid formation in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering* **39**, 663–671.
- Koh, B.T., Nakashimada, U., Pfeiffer, M. & Yap, M.G.S. 1992 Comparison of acetate inhibition on growth of host and recombinant *E. coli* K12 strains. *Biotechnology Letters* **14**, 1115–1118.
- Lischke, H.H.L., Brandes, L., Wu, X. & Schügerl, K. 1993 Influence of acetate on the growth of recombinant *Escherichia coli* JM103 and product formation. *Bioprocess Engineering* **9**, 155–157.
- Majewski, R.A. & Domach, M.M. 1990 Simple constrained-optimization view of acetate overflow in *E. coli*. *Biotechnology and Bioengineering* **35**, 732–738.
- Meyer, H.P., Leist, C. & Fiechter, A. 1984 Acetate formation in continuous culture of *Escherichia coli* K12 D1 on defined and complex media. *Journal of Biotechnology* **1**, 355–358.
- Parr, T.R. & Saier, M.H. 1992 The bacterial phosphotransferase system as a potential vehicle for the entry of novel antibiotics. *Research in Microbiology* **143**, 443–447.
- Ponce, E., Flores, N., Martinez, A., Valle, F. & Bolivar, F. 1995 Cloning of the two pyruvate kinase isoenzyme structural genes from *Escherichia coli*: The relative roles of these enzymes in pyruvate biosynthesis. *Journal of Bacteriology* **177**, 5719–5722.
- Ponce, E., Martinez, A., Bolivar, F. & Valle, F. 1998 Stimulation of glucose catabolism through the pentoses pathway by the absence of the two pyruvate kinase isoenzymes in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering* **58**, 292–295.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. 1989 Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd edn, Cold Spring Harbor Laboratory Press. ISBN 0-87969309-6.
- Sun, W.J., Lee, C., George, H.A., Powell, A.L., Dahlgren, M.E., Greasham, R. & Park, C.H. 1993 Acetate inhibition on growth of recombinant *E. coli* and expression of fusion protein TGF-PE40. *Biotechnology Letters* **15**, 809–814.